

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Petra ORAŽEM

**PREIZKUŠANJE IN UPORABA NOVIH BIOTEHNO-
LOŠKIH PRISTOPOV ZA ŽLAHTNENJE OLJK
(*Olea europaea* L.) SORT 'CANINO' IN 'ISTRSKA
BELICA'**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Petra ORAŽEM

**PREIZKUŠANJE IN UPORABA NOVIH BIOTEHNOLOŠKIH PRIS-
TOPOV ZA ŽLAHTNJENJE OLJK
(*Olea europaea* L.) SORT 'CANINO' IN 'ISTRSKA BELICA'**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**DEVELOPMENT AND USE OF NEW BIOTECHNOLOGICAL
APPROCHES FOR BREEDING OF OLIVES (*Olea europaea* L.) CV.
'CANINO' AND 'ISTRSKA BELICA'**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2013

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Senata Univerze z dnem 27. septembra 2010 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za neposreden prehod na doktorski Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje doktorata znanosti s področja biotehnologije. Za mentorja je bil imenovan prof. dr. Borut Bohanec.

Doktorska disertacija je bila v celoti opravljena na Biotehniški fakulteti v Ljubljani, na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Nataša Štajner
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: doc. dr. Dunja Bandelj
Univerza na Primorskem, Znanstveno – raziskovalno središče, Inštitut za sredozemsko kmetijstvo in oljkarstvo

Član: prof. dr. Borut Bohanec
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora: 20.12.2013

Doktorat je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega dela v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Doktorandka:

Petra ORAŽEM

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	UDK 634:63:606:631.528.631:57.086.83 (043.3)
KG	žlahtnjenje rastlin/ <i>Olea europaea</i> / Canino/ Istrska belica/ tkivne kulture /ionizirajoče obsevanje/ X-žarki/ mikrosatelitski markerji/ adventivna regeneracija/ transformacije /dostavni peptidi
KK	AGRIS F30
AV	ORAŽEM, Petra, univ. dipl. inž. agr.
SA	BOHANEČ, Borut (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje biotehnologije
LI	2013
IN	PREIZKUŠANJE IN UPORABA NOVIH BIOTEHNOLOŠKIH PRISTOPOV ZA ŽLAHTNENJE OLJK (<i>Olea europea</i> L.) SORT 'CANINO' IN 'ISTRSKA BELICA'
TD	Doktorska disertacija
OP	XI, 78 str., 7 pregl., 13 sl., 119 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Pri sorti 'Istrska belica' smo po številnih zapletih uspešno uvedli <i>in vitro</i> kulturo s preizkušanjem različnih gojišč. Mikropropagacija je bila uspešno vzpostavljena šele po tem, ko smo uspeli eliminirati številne glivične okužbe. Nadaljne raziskave so pokazale da gre za endofitske glive, ki smo jih z uporabo morfoloških znakov in genskega testiranja uspešno taksonomsko določili. Za preizkušanje adventivne regeneracije smo uporabili tkivno kulturo oljke, sorte 'Canino'. Po preizkušanju različnih gojišč in dodatkov smo uspeli pridobiti le kalus, nadaljni razvoj pa se je zaustavil ob premestitvi kalusiranih tkiv na novo gojišče. Pri obsevanju rastlin oljke z X-žarki smo uporabili sorto 'Canino', katere <i>in vitro</i> poganjke smo obsevali s tremi dozami sevanja (10, 30 in 60 Gy), z uporabo kovinskega filtra (aluminijaste folije) in pa brez omenjenega filtra. Morfološki znaki obsevanih rastlin z uporabo aluminijastega filtra in prejeto dozo sevanja 10 Gy, so pokazali rahlo povečan odstotek koreninjenja, teža poganjkov pa se je v primeru obsevanja z uporabo aluminijastega filtra pri najvišji dozi zmanjšala za 36%. Izsečki, obsevani brez uporabe kovinskega filtra najvišje doze sevanja niso preživel. Po meritvi velikosti jedra s pretočno citometrijo večjih razlik v velikosti genoma nismo zaznali, se je pa pokazalo rahlo zmanjšanje velikosti genoma pri obsevanih rastlinah s sevalno dozo 30 Gy. Za detekcijo mutacij, nastalih z obsevanjem smo uporabili dva markerska sistema (AFLP in SSR). Z AFLP markerji smo z uporabo 13-ih kombinacij začetnih oligonukleotidov namnožili 630 fragmentov, odstotek polimorfizma pa je znašal 28,4 %. Največ novonastalih fragmentov smo zabeležili pri sevalni dozi 30 Gy, medtem ko je pri obsevanju z 10 Gy naraslo število odsotnih fragmentov v primerjavi s kontrolnimi rastlinami. Z uporabo sedmih mikrosatelitskih markerjev v alelnih profilih uporabljenih lokusov razlik nismo zaznali. Pri preizkušanju novejših metode transformacije z dostavnimi peptidi (CPP) smo v mikropore tobaka uspešno vnesli gen GUS ter zabeležili visok odstotek transformacije, vendar pa se je ponovljivost izkazala za zelo težavno.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
 DC UDC 634:63:606:631.528.631:57.086.83 (043.3)
 CX plant breeding/*Olea europaea*/ Canino/ Istrska belica/ tissue culture/ X-ray irradiation/ microsatellite marker/ adventitious regeneration/ cell penetrating peptides transformation
 CC AGRIS F30
 AU ORAŽEM, Petra
 AA BOHANEČ, Borut (supervisor)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, Field: Biotechnology
 PY 2013
 TI DEVELOPMENT AND USE OF NEW BIOTECHNOLOGICAL APPROCHES FOR BREEDING OF OLIVES (*Olea europea* L.) CV. 'CANINO' AND 'ISTRSKA BELICA'
 DT Doctoral Dissertation
 NO XI, 78 p., 7 tab., 13 fig., 119 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB Following several unsuccessful attempts *in vitro* culture of cv. 'Istrska belica' was established using optimized media components. Micropropagation was obtained after elimination of severe fungal infections. Further studies revealed that endophytic fungi were present within explants. We were able to identify genera of contaminants by morphological observations and by genetic testing. In our attempt to achieve adventitious regeneration of cultivar 'Canino' we haven't been successful. Despite the testing of different media and the concentrations of growth hormones did not gain any adventitious shoots, since in all cases developed only a small callus. Further, we investigated the effects of X-ray irradiation at 0, 10, 30 and 60 Gy delivered to *in vitro* grown shoots of the olive variety 'Canino'. Increasing the dose rate affected all measured parameters. The highest doses caused a shoot weight loss of 36% (aluminum shielding) or completely stunted growth (without shielding); similarly, the average shoot height was decreased at increasing doses. Rooting ability induced after a month of subculturing treated shoots was also affected. In general, a 10 Gy dose did not induce decreased growth but it even a slightly increased in both treatments, while a 30 Gy dose in particular diminished rooting ability. At 60 Gy, shoots were either heavily damaged (aluminum shielding) or growth was completely inhibited (without shielding). The nuclear DNA content of genotypes irradiated at 30 Gy was significantly lower than at 10 Gy. AFLP analysis using 13 primer combinations effectively amplified large numbers of polymorphic loci. The total number of bands ranged between 3 and 159. Altogether, 630 scorable fragments were amplified, among which 179 (28.4%) were polymorphic. Plants irradiated with 10 Gy showed a higher number of absent fragments, while the presence of additional fragments prevailed in plants irradiated with 30 Gy. SSR profiling of all tested samples, derived either from treated (10 and 30 Gy) or non-treated controls showed no variation. In testing the newer methods of transformation with cell penetrating peptides we use microspores of tobacco. For the transformation with CPPs we used GUS gene and obtain a high number of transformed microspores.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija.....	III
Key words documentation.....	IV
Kazalo vsebine.....	V
Kazalo preglednic.....	VIII
Kazalo slik.....	IX
Kazalo prilog.....	X
Okrajšave in simboli.....	XI
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 OLJKA	4
2.1.1 Biološke značilnosti oljke	4
2.1.2 Oljkarstvo v Sloveniji.....	5
2.1.3 Predstavitev lokalnih sort, zastopanih v slovenskih oljčnikih.....	6
2.1.3.1 Sorta 'Istrska belica'	6
2.1.3.2 Sorta 'Buga'	7
2.1.3.3 Sorta 'Črnica'	7
2.1.3.4 Sorta 'Štorta'	7
2.2 INTEGRACIJA NOVIH BIOTEHNOLOŠKIH METOD V PROGRAM ŽLAHTNJENJA OLJK.....	8
2.2.1 Somaklonska variabilnost.....	8
2.2.2 Molekulski markerji v genetskih študijah	8
2.2.3 AFLP markerji	9
2.2.4 Mikrosatelitski markerji.....	10
2.3 GENETSKE TRANSFORMACIJE PRI OLJKI.....	11
2.3.1 Transformacije z dostavnimi peptidi.....	11
2.3.2 Uporaba ionizirajočega sevanja v žlahtnjenju rastlin	12
2.3.3 Endofitske glive.....	16
3 MATERIAL IN METODE	18

3.1	VZPOSTAVITEV TKIVNE KULTURE 'ISTRSKE BELICE' <i>in vitro</i>	18
3.1.1	Izbira donorskih rastlin	18
3.1.2	Iniciacija tkivne kulture	18
3.1.3	Izdolževanje poganjkov	20
3.1.4	Razmnoževanje poganjkov <i>in vitro</i>	21
3.1.5	Preverjanje endogenih okužb	21
3.2	OBSEVANJE <i>in vitro</i> RASTLIN OLJKE SORTE 'CANINO' Z X-ŽARKI	22
3.2.1	Rastlinski material	22
3.2.2	Obsevanje z X-žarki	23
3.2.3	Morfološke meritve obsevanih tkiv	23
3.2.4	Koreninjenje in aklimatizacija	23
3.2.5	Merjenje velikosti genoma s pretočno citometrijo	24
3.3	AFLP METODA	24
3.3.1	Rastlinski material	24
3.3.2	Izolacija DNA	24
3.3.3	Merjenje koncentracije DNA	25
3.3.4	Namnoževanje AFLP markerjev v verižni reakciji s polimerazo	25
3.3.5	Vrednotenje markerjev AFLP	27
3.4	MIKROSATELITSKI MARKERJI	27
3.4.1	Rastlinski material	27
3.4.2	Izolacija DNA	27
3.4.3	Merjenje koncentracije DNA	27
3.4.4	Namnoževanje DNA v verižni reakciji s polimerazo	27
3.4.5	Vrednotenje mikrosatelitskih markerjev	29
3.5	ADVENTIVNA REGENERACIJA OLJKE SORTE 'CANINO'	29
3.5.1	Izbira primerne tkiva	29
3.5.2	Optimizacija gojišč	29
3.6	TRANSFORMACIJA MIKROSPOR Z DOSTAVNIMI PEPTIDI NA MODELNI RASTLINI	30
3.6.1	Priprava in uporaba testnih rastlin	30
3.6.2	Postopek transformacije	31
3.6.3	Detekcija transformiranih celic	32

4	REZULTATI	33
4.1	OPTIMIZACIJA PROTOKOLA ZA VZPOSTAVITEV <i>in vitro</i> KULTURE 'ISTRKE BELICE'	33
4.2	OBDELAVA REZULTATOV MORFOLOŠKIH MERITEV NA OBSEVANIH RASTLINAH	39
4.3	REZULTATI MERJENJA VELIKOSTI GENOMA S PRETOČNO CITOMETRIJO	41
4.4	ANALIZA AFLP	43
4.4.1	Rezultati in analiza AFLP markerjev	43
4.5	ANALIZA MIKROSATELITSKIH MARKERJEV	48
4.5.1	Rezultati in analiza mikrosatelitskih markerjev	48
4.6	TRANSFORMACIJA MIKROSPOR Z DOSTAVNIMI PEPTIDI	50
4.6.1	Rezultati in detekcija transformiranih mikrospor	50
4.7	ADVENTIVNA REGENERACIJA PRI SORTI 'CANINO'	51
4.7.1	Rezultati optimizacije gojišč	52
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	54
5.1	ANALIZA <i>in vitro</i> VZPOSTAVITVE TKIVNE KULTURE 'ISTRKE BELICE' .	54
5.2	ANALIZA UPORABE IONIZIRAJOČEGA SEVANJA ZA NAMEN ŽLAHTNENJA OLJKE	57
5.3	OCENA MERITEV VELIKOSTI GENOMA S PRETOČNO CITOMETRIJO	59
5.4	ANALIZA MARKERJEV AFLP	59
5.5	ANALIZA MIKROSATELITSKIH MARKERJEV	61
5.6	OCENA PRIMERNOSTI POSTOPKA TRANSFORMACIJE Z DOSTAVNIMI PEPTIDI.....	63
5.7	POMEN IN ANALIZA POSKUSA ADVENTIVNE REGENERACIJE PRI SORTI 'CANINO'	65
6	POVZETEK (SUMMARY)	66
6.1	POVZETEK	66
6.2	SUMMARY	68
7	VIRI	73

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Seznam uporabljenih mikrosatelitskih lokusov	28
Preglednica 2: Pregled vseh poskusov pred uspešno vzpostavitev in vitro tkivne kulture 'Istrske belice'	34
Preglednica 3: Morfološke meritve obsevanih nodijskih izsečkov po 30 dneh v tkivni kulturi, s filtrom aluminijaste folije	40
Preglednica 4: Morfološke meritve obsevanih nodijskih izsečkov po 30 dneh v tkivni kulturi, brez filtra aluminijaste folije	40
Preglednica 5: Določitev velikosti jedrnega genoma s pretočno citometrijo	42
Preglednica 6: Skupno število namnoženih fragmentov, odstotek polimorfizma in število polimorfni fragmentov, namnoženih s 13-imi kombinacijami AFLP začetnih oligonukleotidov	44
Preglednica 7: Dolžine alelov šestih mikrosatelitskih lokusov testiranih na obsevanih (10 Gy, 30 Gy) in kontrolnih rastlinah oljke, sorte 'Canino'	49

KAZALO SLIK

Slika 1: Sorta 'Istrska belica'	6
Slika 2: Prikaz razreza nodijskih izsečkov iz enoletnih poganjkov sorte 'Istrska belica'	18
Slika 3: Apikalni in terminalni nodiji namenjeni vzpostavitvi tkivne kulture 'Istrske belice'.	20
Slika 4: Primer uspešne faze iniciacije iz poskusa št. 10.....	33
Slika 5: Izračanje glive iz nodijskega izsečka po enem mesecu	35
Slika 6: Okužen nodijski izseček v <i>in vitro</i> kulturi sorte 'Istrska belica'	36
Slika 7: Faza iniciacije <i>in vitro</i> kulture oljke sorta 'Istrska belica'	37
Slika 8: Faza izdolževanja poganjkov sorte 'Istrska belica' <i>in vitro</i>	38
Slika 9: Uspešna rast poganjkov oljk sorte 'Istrska belica'	38
Slika 10: Obsevane in ukoreninjene oljke sorte 'Canino' v steklenjaku Oddelka za agronomijo.....	41
Slika 11: AFLP elektroferogram <i>Pst</i> -aac/ <i>Mse</i> -ag kombinacije začetnih oligonukleotidov; puščice prikazujejo (a),(b) odsotnost fragmenta, prisotnega v kontrolni rastlini in (c),(d) pojav novega fragmenta glede na kontrolno rastlino, pri sevalni dozi 10 Gy	45
Slika 12: Skupno število novih ali odsotnih fragmentov za vsako kombinacijo začetnih oligonukleotidov posebej, pri sevalni dozi 10 Gy (a) in 30 Gy (b).....	46
Slika 13: Skupno število novih in odsotnih fragmentov glede na kombinacijo začetnih oligonukleotidov za sevalno dozo 10 Gy in 30 Gy	46
Slika 14: Transformirane modro obarvane mikrospore tobaka (<i>Nicotiana tabacum</i>) in netransformirane mikrospore (neobarvane) pri 10-kratni povečavi (A) in 20- kratni povečavi (B).....	51

KAZALO PRILOG

Priloga A: Rezultati poravnave zaporedij z uporabo podatkovne baze BLAST in identifikacijski podatki z odstotki ujemanja pri analizi endofitskih gliv z markerji ITS

Priloga B: Rezultati preizkušanja različnih gojišč za vzpostavitev adventivne regeneracije pri sorti 'Canino' s podrobnimi opisi gojišč in rezultati

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AFLP	polimorfizem namnoženih fragmentov (ang. Amplified Fragment Length Polymorphism)
BLAST	ang. Basic Local Alignment Search Tool)
CTAB	cetil trimetil amonijev bromid
DICA	dikloroizocianurna kislina natrijeve soli
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksi nukleotid trifosfat
DKW	gojišče po Driver in Kunyuki, 1981
GA ₃	giberelinska kislina
Gy	Gray, enota za absorbirano dozo ionizirajočega sevanja
IAA	indol 3-ocetna kislina
IBA	indol maslena kislina
M	molarnost
MS	gojišče po Murashige in Skoog, 1962
OM	gojišče po Rugini, 1984 (ang. Olive Medium)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)
pg	pikogram
PI	propidijev jodid
RAPD	naključno namnožena polimorfna DNA (ang. Random Amplified Polymorphic DNA)
RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (ang. Restriction Fragment Length Polymorphism)
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TDZ	tidiazuron
TE	tris EDTA
TNE	tris EDTA NaCl pufer

1 UVOD

Oljka (*Olea europaea* L.) spada med najstarejše udomačene vrste sadnih dreves, njeni produkti pa so cenjeni že iz starodavnih časov. Oljka kot drevo, je simbol rodnosti, slave in miru. O gojenju tega nesmrtnega drevesa poročajo že zapisi iz 5000 let pred Kristusom na Kreti, v Siriji, Palestini in Izraelu. S širitvijo Grške kulture, pa se je kultura gojenja oljke hitro razširila po celem Sredozemlju. V svetovnem merilu oljčniki zavzemajo površino kar 7,5 milijonov hektarjev. Olje, iztisnjeno iz mezokarpa sadeža oljke je cenjeno kot visoko kakovostno živilo, v preteklosti pa je bila uporaba tega olja razširjena tudi za druge namene, kot je gorivo za sveče, obdelovalno sredstvo za volno ter za različne namene v medicini (Therios, 2009). V sedanjem času se uporaba oljčnega olja povečuje, saj se moderne smerice zdravega prehranjevanja nagibajo k uživanju kakovostnih maščob. Po podatkih, pridobljenih s strani Ministrstva za kmetijstvo in okolje, je bila povprečna poraba oljčnega olja v Sloveniji, v letu 2011, 1 liter na prebivalca, od tega pa 20 % predstavlja olje slovenskega porekla (Program spremljanja ..., 2013).

Razmnoževanje oljk je bilo do druge polovice 19. stoletja predvsem oziroma samo nespolno, z uporabo potaknjencev ali ukoreninjenih poganjkov. Kasneje, proti koncu stoletja se je zaradi povečanega povpraševanja po zasaditvi novih dreves v oljčnikih začela uporabljati tudi metoda indirektnega razmnoževanja, s precepljanjem sadik. V zadnjih nekaj desetletjih lahko v objavljenih strokovnih člankih opazimo, da so bile raziskave usmerjene predvsem v postopek razmnoževanja s potaknjenci. Poleg tega pa zanimanje za razmnoževanje s cepljenjem in razmnoževanje s semeni še vedno narašča. Prav zato je smiselno, da preučimo vse načine razmnoževanja pri oljki, od tradicionalnih, pa vse do *in vitro* razmnoževanja ter bolj naprednih, biotehnoloških metod.

In vitro vzgoja omogoča nove možnosti žlahtnjenja in klonskega razmnoževanja, ki nadgrajujejo standardne žlahtniteljske postopke. Uvedba mikropropagacije omogoča hitro klonsko razmnoževanje in možnost izboljšave zdravstvenega statusa sadik. *In vitro* tretiranje meristemov tako olajša selekcijo izzvanih ali somaklonsko nastalih mutantov. Somaklonsko izzване mutacije omogočajo uporabo selekcijskega pritiska, denimo selekcijo mutantov odpornih na glivični toksin ali abiotske faktorje.

Z uporabo modernih biotehnoloških metod lahko pri oljki pomembno vplivamo na samo rast drevesa, zorenje plodov, odpornost na abiotski stres, višino drevesa, zmanjšanje pojava izmenične rodnosti in pa strukturo krošnje, ki lahko pridelovalcem oljk bistveno olajša oziroma spremeni način pridelave oljk ali oljčnega olja (Rugini in sod., 2006). Drugi pomembni nameni žlahtnjenja pa so zagotovo tudi izboljšanje tolerance na mraz, ki bi zagotovila pridelavo oljk tudi v hladnejših območjih, in pa spodbujanje samorodnosti, s čimer se izognemo odvisnosti od tujih oprašiteljev. Trend v sedanjem času je, da bi z upo-

rabo novejših biotehnoloških tehnik v žlahtnjenju tega stoletnega drevesa lahko znatno izboljšali obstoječe sorte z izjemnimi lastnostmi (Guerin in sod., 2002). Takšne raziskave denimo potekajo pri preučevanju *in vitro* vzgoje oljk, zelo pomembnih sort, kot so 'Kalamon', 'Frantoio' in 'Picholine'. Omenjene sorte so za vzgojo *in vitro* precej neodzivne, problemi pa se pojavljajo tudi s koreninjenjem *in vitro* vzgojenih sadik. S preučevanjem različnih dejavnikov, kot je razmerje dušika in ogljika v gojišču, dodajanje putrescina in uporabo hidrogen peroksida, je raziskovalcem uspelo precej izboljšati koreninjenje omenjenih sort (Zuccherelli in Zuccherelli, 2002). V prihodnosti lahko s preučevanjem možnosti uporabe novih biotehnoloških metod za žlahtnjenje oljke pričakujemo raziskave tudi na področju višine in pa oblike krošnje samega drevesa, saj je znano, da obstaja nekaj genov, ki odločilno vplivajo na to lastnost (Therios, 2009). Prav tako je znano, da je ob stresnih dejavnikih, kot je denimo suša vedno prisoten tudi protein osmotin. Negativne vplive pomanjkanja vode pri oljki bi lahko s pomočjo uporabe sort, odpornih na sušo, uspešno premostili in zagotovili pridelek, primerljiv z drevesi, ki rastejo v optimalnem okolju. Vse to pa predstavlja le zelo majhen del zgodbe o uspešni uporabi biotehnoloških pristopov za žlahtnjenje oljke, saj so možnosti uporabe praktično neomejene.

Tekom rasti so oljka in njeni plodovi izpostavljeni različnim boleznim in škodljivcem. 'Istrska belica' je posebej občutljiva na glivično bolezen, imenovano pavje oko (*Spilocaea oleagina*), ki se pojavlja predvsem v vlažnih in nižinskih predelih. Zadnji, močan izbruh bolezni je bil v letu 2010, zaradi obilnih in gostih padavin v jeseni prejšnjega leta, ki so se nadaljevale tudi v pomlad. Na okuženih listih se pojavljajo značilni okrogli madeži, ki list poškodujejo, le-ta pa na koncu porumeni in odpade. Druga pomembnejša bolezen je tudi siva oljkova pegavost (*Mycocentrospora cladosporioides*), in je v zadnjih letih vse pomembnejša. Pri močnejših okužbah listi močno odpadajo, posledica pa je slaba rodnost v naslednjih letih. Prav zaradi pojava teh bolezni, ki so vsako leto v porastu, je pridobitev brezvirusnega materiala in odkrivanja novih možnosti razmnoževanja oljk *in vitro* posebnega pomena.

Sorta 'Istrska belica' je zaradi številnih dobrih lastnosti, kot so visoka oljevitost, dobra in redna rodnost, visoka kakovost in specifičnost oljčnega olja, najbolj zastopana sorta v slovenski Istri. Zaradi zgoraj omenjenih lastnosti, dobre prilagojenosti na naše klimatske razmere in visoke zastopanosti v naših oljčnikih, je bila tekom doktorskega študija sorta 'Istrska belica' izbrana za namen preizkušanja novih biotehnoloških metod, s katerimi bi lahko vplivali na izboljšanje že omenjenih lastnosti in s tem pripomogli še k večji prepoznavnosti sorte, ter lažji obdelavi samih dreves, kar pa ima navsezadnje tudi velik gospodarski pomen.

Cilj doktorske naloge je predvsem preučiti uporabo novejših biotehnoloških tehnik in pristopov za namen žlahtnjenja oljke. Sem spadajo: vzpostavitev *in vitro* kulture slovenske udomačene sorte 'Istrska belica' ter premagovanje omejujočih dejavnikov pri postopku

mikropropagacije, ovrednotenje morfoloških in genetskih sprememb ob izpostavitvi tkiv oljke ionizirajočemu sevanju, poskus vzpostavitve adventivne regeneracije in pa uvedba novejših metod transformacije, kamor spada transformacija z dostavnimi peptidi, ki smo jo izvedli na testni rastlini.

2 PREGLED OBJAV

2.1 OLJKA

2.1.1 Biološke značilnosti oljke

Oljka je heliofilna, zimzelena drevesna oziroma grmasta trajnica, s sivo-zelenimi listi in majhnimi belimi cvetovi, ki v spomladanskem času tvorijo veliko cvetnega prahu. Je tujeprerashnica, ki tradicionalno uspeva v Sredozemlju, kjer se nahaja 90 % vseh oljčnikov. Rastline so v Sredozemlju izpostavljene stresnim razmeram. Suše, pozebe in onesnaženost zraka, so glavni omejujoči dejavniki pri gojenju oljk. Za sredozemsko območje je značilno, da ima manj kot 400 mm padavin, ki so razporejene večinoma jeseni in pozimi, zato so oljke v poletnem času precej izpostavljene sušnim razmeram. Naslednji omejujoči dejavnik, s katerim se soočajo pridelovalci oljk pri nas so nizke temperature. Večje pozebe se v Sloveniji pojavljajo navadno na vsakih 25 do 30 let, z vmesnimi manjšimi pozebami. Kritičnost nizkih temperatur je odvisna predvsem od letnega ciklusa oljke. V obdobju zimskega počitka, ki taja nekje od decembra do februarja, oljka prenese -6°C do -7°C za nekaj ur, če pa se nizke temperature nadaljujejo več dni, lahko pride do poškodb. Temperature, ki so nižje od -13°C lahko povzročijo veliko škode, čeprav trajajo le kratek čas. Konec februarja in v začetku marca oljka vstopi v fazo spomladanskega brstenja, sočasno pa poteka tudi diferenciacija cvetnih brstov. Posebej v tem času lahko nizke temperature, povzročijo veliko škodo (Vesel, 1998).

Gojena oljka ima lahko eno ali več debel, višina drevesa pa je odvisna predvsem od sorte, pedoklimatskih razmer in agrotehničnih ukrepov. Koreninski sistem je plitek in razraščan, vendar v globino ne sega več kot 60 do 70 cm. Razvoj koreninskega sistema je v veliki meri odvisen od dostopnosti vode in pa same sorte. V splošnem velja, da imajo drevesa oljk z globljim in dobro razvejanim koreninskim sistemom precej večjo sposobnost prilagajanja na sprejemanje vode in nujno potrebnih hranil. Odrasla drevesa lahko merijo v višino od 8-10 metrov in preživijo več stoletij (Therios, 2009).

V naših razmerah je cvetenje oljke omejeno na drugo polovico maja pa do začetka junija. Oljčno socvetje je lataste oblike, število cvetov na socvetje pa je predvsem odvisno od sorte, vlažnosti prsti in količine dušika v listih. Daljše hladno obdobje skozi mesec april in maj, ko se cvetovi pospešeno razvijajo, ima zelo negativne posledice na nadaljne cvetenje, opraševanje in končno tudi na razvoj plodov. Za uspešen razvoj cvetov in optimalen pridelek pa je pomembna še sama osvetlitev rastline. Pomanjkanje svetlobe lahko namreč vodi v nepravilni razvoj cvetov, kar pomeni tudi izpad pridelka. Pri zelo močnih in razvejanih krošnjah je prav zato pomembno, da se vzdržuje pravilna gojitvena oblika, da so veje in cvetovi na drevesu razporejeni tako, da je osvetljenost kar največja (Therios, 2009).

Juvenilna faza je definirana kot obdobje, v kateri rastlina ne more proizvajati cvetov. Trajanje juvenilne dobe pri drevesnih rastlinah, kamor spada tudi oljka, pa je zelo različno. Juvenilna in zrela rastna doba se ločita predvsem po morfoloških znakih. Pri oljki so razlike na morfološkem nivoju vidne predvsem v obliki in velikosti listov, prerazporeditvi listov in sposobnosti tvorjenja adventivnih korenin in brstov (Therios, 2009).

2.1.2 Oljkarstvo v Sloveniji

Jugozahodni del Slovenije, ki je reliefno odprt proti Tržaškemu zalivu in Sredozemlju, ima milejše podnebne razmere v primerjavi s pokrajinami v sami notranjosti države. Z vidika uspevanja toplotno zahtevnejših kultur, kar oljka zagotovo je, so pomembne predvsem višje temperature in trajanje sončnega obsevanja, ki je v tem delu Slovenije najdaljše. Nasadi oljk v Slovenski Istri in manjši nasadi v Goriških Brdih in Vipavski dolini ter nekateri rastišča v severni Italiji so na enem najsevernejših območij, do koder oljke še uspevajo in je njihovo gojenje gospodarno.

V Sloveniji je posajenih 1831 ha oljčnikov. Ocenjuje se, da je dodatnih, potencialnih površin, zlasti zemljišča v zaraščanju, za skoraj 1000 ha. V povprečju so oljčniki majhni (0,3 ha) in razdrobljeni, le 4 % oljčnikov je velikih nad 1 ha. Do pospešenega razvoja oljkarstva je prišlo po pozebi v letu 1985, s pomočjo finančne podpore občin in države. Trend naraščanja oljčnih dreves je prisoten od leta 1988, hkrati je prisoten trend prehoda iz ekstenzivne v intenzivnejše gojenje oljk. Obnove oljčnikov so naraščale do leta 1996, ko je bila obnova najvišja, približno 60 ha letno, v zadnjih letih pa je letno vzpostavljenih okoli 20 ha novih oljčnih nasadov. Del konvencionalne pridelave se je spreobrnil v okolju prijaznejši način pridelave. V letu 2011 je bila integrirana pridelava na 187 ha, ekološka pa na 93 ha oljčnikov. Velik napredek je zaznati v kakovosti oljčnega olja, saj med analiziranim oljčnim oljem, približno 90 % dosega najvišji standard ekstra deviško oljčno olje, razvijati pa se je začelo tudi področje pridelave namiznih oljk (Program spremljanja ..., 2013).

Slovenska pridelava oljčnega olja je v primerjavi z EU državami pridelovalkami oljčnega olja po količini sicer zanemarljiva, vendar pa oljčno olje dosega visoko kakovost. Vodilne svetovne proizvajalke oljčnega olja so sredozemske države EU, in sicer Italija, Grčija, Španija in Portugalska, ki proizvedejo kar 80 % celotne svetovne proizvodnje oljčnega olja. Vendar je pri njih v zadnjih letih že zaznati kopičenje zalog in zaradi tega padec cen oljčnega olja. Izvoz slovenskega oljčnega olja je zanemarljiv, uvoz pa dosega do 1600 ton (Program spremljanja ..., 2013).

Ocenjujejo, da je pri nas med 2000 in 2500 oljkarjev. Velik delež je tistih, ki pridelajo olje le za lastne potrebe, delež tržne pridelave pa je le približno 64 %. Letna pridelava oljk znaša približno 2500 ton, pridelava oljčnega olja pa je letno ocenjena na 500 do 700 ton. Pridelujejo se predvsem sorte za olje (Program spremljanja ..., 2013). Prevladuje udomačena sorta 'Istrska Belica', sledi ji italijanska sorta Leccino, v manjši meri pa so prisotne še sorte

'Pendolino', 'Maurino', 'Frantoio', 'Leccione', 'Črnica', 'Buga', 'Lecco di corno' in 'Arbequina. Pridelava oljk za vlaganje pokriva predvsem samooskrbo oljkarjev, najpogostejše sorte pa so 'Štorta', 'Ascolana' in 'Santa Catarina' (Vesel, 1998).

Oljkarstvo ima v slovenski Istri in na Goriškem dolgoletno tradicijo in je pomembno za ohranjanje kulturne mediteranske krajine ter za trajnostni razvoj tega območja, kar lahko pomembno vpliva tudi na razvoj turizma (Program spremljanja ..., 2013).

2.1.3 Predstavitev lokalnih sort, zastopanih v slovenskih oljčnikih

2.1.3.1 Sorta 'Istrska belica'



Slika 1: Sorta 'Istrska belica'

Figure 1: Variety 'Istrska belica'

Sorta 'Istrska belica' se je začela širiti po pozebi leta 1956, zaradi svoje dobre lastnosti, prenašanja nizkih temperatur. Njena zastopanost v slovenskih oljčnikih je precej visoka, medtem ko je zastopanost sorte v svetovnem in evropskem merilu precej nizka. To lahko pripišemo specifičnim lastnostim, kot so pozen začetek rodne dobe, ter občutljivost na pav-je oko, oljčno muho in oljčnega molja.

Sorta 'Istrska belica' je slovenska udomačena sorta s številnimi sinonimi, kot so: 'Belica', 'Bianchera', 'Žlahtna belica', 'Cepljena Belica', 'Bianca Istriana'. Sorta ima pokončno, zapr-

to in metlasto rast ter nekoliko poznejši vstop v rodno dobo. Plodovi so srednje debeli, barva plodov pa se v obdobju dozorevanja spreminja od svetlo zelene, temno rdeče do skoraj črne barve. Dozoreva neenakomerno in pozno v jeseni, obiranje plodov pa poteka v prvi polovici novembra. V obdelanih nasadih sorta enakomerno in redno rodi, kar štejemo med njene zelo dobre lastnosti. Prav tako je sorta zelo dobro prilagojena na nekoliko nižje temperature, občutljiva pa je za oljčno muho, pavje oko in oljčnega molja. Plodovi te sorte so namenjeni predvsem predelavi za olje, saj se ponaša z visoko stopnjo oljevitosti. Njeno olje je običajno sveže, pikantno, z visoko vsebnostjo polifenolov in nizko vsebnostjo tokoferolov (Program razvoja ..., 2009).

2.1.3.2 Sorta 'Buga'

Sorta 'Buga' je slovenska avtohtona sorta, ki je razširjena na območju celotne Istre, vendar je prisotna v manjših nasadih ali pa le s posameznimi drevesi. Ima sinonime, kot so: Boga, Bugi, Piranska Buga, Buso di Pirano, Bugla. Sorta spada med srednje bujne, z lepo, gosto krošnjo in s srednje debelimi plodovi, ki se zgodaj obarvajo v črno in se zelo hitro nagubajo. Zanja je značilna izmenična rodnost in pa zgodnje dozorevanje plodov. Vsebnost olja v plodovih je nizka, olje pa vsebuje precej polifenolov in tokoferolov. Velja za odporno sorto na nizke temperature, odporna pa je tudi proti pavjemu očesu in manj občutljiva na oljčno muho (Program razvoja ..., 2009).

2.1.3.3 Sorta 'Črnica'

Sorta 'Črnica', s sinonimi: 'Karbonja', 'Nera', 'Mora', 'Piranska črnica', 'Carbania' in 'Carbogni di Pirano' spada med avtohtone slovenske sorte oljk. Njena razširjenost je omejena na območje Istre. Drevo sorte 'Črnica' je srednje bujno, krošnja je razširjena in srednje gosta, internodiji pa so daljši. Plodovi so srednje debeli, v zrelosti pa preidejo v črno barvo. Sorta dozoreva zgodaj, prvi dozori že konec oktobra, obiranje pa navadno poteka v prvi polovici novembra. V rodno dobo sorta vstopa pozno, rodnost pa je srednja in pogosto tudi izmenična. 'Črnica' je precej občutljiva na nizke temperature, vendar se po pozebi zelo dobro in hitro obnavlja (Program razvoja ..., 2009).

2.1.3.4 Sorta 'Štorta'

Sorta je že dolgo razširjena na območju Istre in spada med avtohtone sorte oljk. S sinonimi: 'Ukrivljena', 'Fažolina', 'Piranska ukrivljena' in 'Storta di Pirano' spada med sorte, katere plodovi so namenjeni predvsem za vlaganje. Njeno drevo je bujne rasti, vendar pa je krošnja precej redka. Plodovi so srednje debeli do debeli, značilne podolgovate oblike in nekoliko asimetrični. Koščica se zelo hitro loči od mesa, meso pa je okusno in primerne konsistence. Rodnost je razmeroma dobra in redna, zaradi zgodnjega zorenja pa se jo ponavadi obira v mesevu oktobru (Program razvoja ..., 2009).

2.2 INTEGRACIJA NOVIH BIOTEHNOLOŠKIH METOD V PROGRAM ŽLAHTNENJA OLJK

2.2.1 Somaklonska variabilnost

Rast in razvoj rastlin v tkivni kulturi pogosto povzroči nastanek dednih sprememb, ki jih imenujemo somaklonska variabilnost. Variabilnost regeneriranih rastlin je lahko posledica obstoječe genske raznolikosti tkiv inokulirane rastline, ki se izrazi šele s postopki v tkivnih kulturah, ali pa nastane na novo kot posledica postopkov in sestavine gojišč. Slednje nastajajo v tkivnih kulturah predvsem v kalusnem tkivu ali v kulturah posameznih celic, kot so celične suspenzije in protoplasti in manj pogosto pri razmnoževanju iz apikalnih in aksilarnih brstov. Z izkoriščanjem pojava somaklonske variabilnosti pri okrasnih rastlinah so požlahtnili rastline s spremenjenim habitusom, obliko in velikostjo listov in cetov, številom cvetov in spremenjenim časom cvetenja (Rout in sod., 2006). Cilj novejših biotehnoloških metod je poleg ohranjanja genskega nabora določene vrste, tudi povečanje variabilnosti z eksogenimi dejavniki in ustvarjanje novih genotipov (Rugini in sod., 2006).

Do sedaj je o uspešnosti somaklonske variabilnosti pri oljki poročalo le nekaj avtorjev. Za doseganje tega cilja je najpomembnejši ponovljiv in zanesljiv protokol regeneracije in potrditve sorte, namenjene izboljšanju določenih lastnosti sorte. Regeneracija iz somatskih embrijev se je izkazala za zelo težavno in zahtevno metodo pri oljki in je bila zaenkrat dosežena le pri sorti 'Canino'. Za namen povečanja genetske raznolikosti se v večini primerov uporablja tehnika, kjer so embriji ali embriogeno tkivo izpostavljeni različnim selektivnim pritiskom. Najbolj razširjena metoda je izpostavitve embrijev ali embriogenega tkiva ionizirajočemu sevanju, uporaba različnih selektivnih gojišč z dodatki gliv in njihovimi toksini ali pa rast na različnih gojiščih z izbranim patogenom. Vse te tehnike omogočajo spremembe tkiva in izbiro spremenjenega materiala (Rugini in sod., 2006).

2.2.2 Molekulski markerji v genetskih študijah

Prvi markerji namenjeni identifikaciji različnih sort oljk so temeljili predvsem na morfoloških in agronomskih lastnostih. Razlike med sortami so se tako opisovale kot zaznavanje fenotipskih razlik. Te meritve so bile enostavne in dostopne vsakomur, vendar pa so težave nastopile že pri identifikaciji sort v zgodnjem obdobju rasti. Prav tako je bilo na podlagi morfoloških meritev zaznano precej majhno število polimorfizmov, ki niso bili okoljsko pogojeni. Poleg tega je bilo število razpoložljivih markerjev omejeno, odvisnost markerjev od razvojne stopnje rastline in okolja pa je predstavljalo dodatno bariero. Zaradi nezanesljivosti opisanih tehnik in velike variabilnosti med sortami ter veliki prisotnosti sinonimov je bila učinkovita metoda za identifikacijo nujno potrebna. Molekulski markerji predstavljajo veliko prednost pred fenotipskim razlikovanjem med sortami. Zaradi visoke stopnje polimorfnosti in zaznavanja, se je uporaba molekulskih markerjev izkazala kot zelo učinkovita.

kovita metoda pri odkrivanju in identifikaciji sort v genskem naboru oljk (Gomes in sod., 2012).

V zadnjih letih so bili markerji pri oljki uporabljeni predvsem za identifikacijo sort in razumevanje njihovih sorodstvenih razmerij. Molekulski marker je katerokoli specifično zaporedje DNA, ki ga lahko brez večjih težav odkrijemo in spremljamo njegovo dedovanje. Takšni markerji so lahko sledljivi s tehnikami hibridizacije (markerji RFLP) ali pa s tehnikami na osnovi verižne reakcije s polimerazo (PCR). Molekulski markerji imajo pomembno vlogo pri razlikovanju, karakterizaciji, pojasnjevanju izvora in raznolikosti oljk (Gomes in sod., 2012). Za ocenjevanje genetske raznolikosti je bilo narejenih veliko raziskav. Raziskovalci so v obsežnih študijah za proučevanje genoma oljke uporabili RAPD markerje (Belaj in sod., 2003; Cordeiro in sod., 2008; Gemas in sod., 2004; Gomes in sod., 2009; Martins-Lopes in sod., 2007, 2009; Trujillo in sod., 1995) in markerje ISSR (Essadki in sod., 2006; Gemas in sod., 2004; Gomes in sod., 2009; Martins-Lopes in sod., 2007, 2009).

RFLP (polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov) molekulski markerji temeljijo na analizi vzorcev iz razrezane DNA sekvence, z znanimi specifičnimi restrikcijskimi encimi in hibridizacijo s specifičnimi sondami. V sedanjem času je uporaba RFLP markerskega sistema precej omejena zaradi nekaterih negativnih lastnosti, ki se pojavijo pri sami analizi. Omenjen markerski sistem velja za dolgotrajnega, reagenti so nemalokrat toksični, posebno težavo pa predstavlja zahteva po količinsko visokem deležu in visoki kvaliteti izhodiščne DNA, kar še bolj poudarja kompleksnost in zahtevnost metode (Agarwal in sod., 2008). Omenjene markerje so raziskovalci uporabili v študijah genetske raznolikosti kloroplastne in mitohondrijske DNA z namenom rekonstrukcije širjenja oljk v sredozemlju, ugotavljanju raznolikosti in sorodnosti divjih in kultiviranih oljk (Besnard in sod., 2002).

2.2.3 AFLP markerji

Princip delovanja AFLP (polimorfizem namnoženih fragmentov) je v osnovi precej preprost in je sestavljen iz treh korakov (Vos in sod., 1995). Prvi korak je priprava predloge, oziroma osnovne plošče, kjer poteka razrez DNA z restrikcijskimi endonukleazami in ligacija oligonukleotidnih adapterjev. Drugi korak vsebuje amplifikacijo oziroma namnoževanje fragmentov, tretji korak pa je gelska analiza, ki je v sodobnem času največkrat opravljena z elektronsko kapilarno elektroforezo (Gomes in sod., 2012). Tehnika AFLP markerjev je učinkovita metoda in se veliko uporablja tudi v sedanjem času. Prednosti omenjenega markerskega sistema so predvsem visoka stopnja učinkovitosti, zanesljivost in pa učinkovitost v študijah genetske variabilnosti (Ercisli in sod., 2009).

Zaradi visoke stopnje učinkovitosti in zanesljivosti pri študijah genetske raznolikosti (Ercisli in sod., 2009), je bila prav tehnika z markerji AFLP uporabljena za obsežne raziskave španskih sort z namenom določitve intaspecifičnih razlik med oljkami (Sanz-Cortés in

sod., 2003). Raziskovalci so jih v svojih študijah uporabili tudi kot učinkovit sistem zaznavanja polimorfizmov in zaznavanje naključnih regij genoma pri oljki. Predvsem za preučevanje genetske raznolikosti in sorodnosti (Ercisli in sod., 2009; Grati-Kamoun in sod., 2006; Montemurro in sod., 2005).

2.2.4 Mikrosatelitski markerji

Mikrosatelitski markerji ali SSR (single sequence repeat) so sestavljeni iz kratkih (1-6 baznih parov), ponavljajočih odsekov DNA, ki se pojavljajo v genomu mnogih višjih organizmov (Rafalski in Tingey, 1993; Wu in Tanksley, 1993).

V primerjavi mikrosatelitskih markerjev in markerjev AFLP ali RAPD markerjev, imajo mikrosatelitski markerji prednost zaradi kodominantne narave, saj lahko na vsakem lokusu zaznamo dva alela. Glavno slabost markerskega sistema SSR pa predstavlja predhodno poznavanje sekvenc DNA za optimalen razvoj začetnih oligonukleotidov (Gomes in sod., 2012).

Mikrosateliti združujejo lastnosti različnih markerjev, zaradi česar jih raziskovalci v literaturi predstavljajo kot idealen markerski sistem za genetske študije (Belaj in sod., 2003; Bracci in sod., 2009; Gomes in sod., 2009; Sabino in sod., 2006; Sarri in sod., 2006; Sefc in sod., 2000). Poleg visoke pogostosti pojavljanja v evkariotskih genomih, jih odlikujejo še kodominantna narava, hipervariabilnost, visoka stopnja polimorfizma ter informativnost (Gomes in sod., 2012).

Mikrosatelitski lokusi izolirani iz oljke (Carriero in sod., 2002; Cipriani in sod., 2002; De la Rosa in sod., 2003; Rallo in sod., 2000; Sefc in sod., 2000) so bili uporabljeni samostojno ali v kombinaciji z drugimi molekulskimi markerji za namen karakterizacije oljčnih sort (Belaj in sod., 2004; Gomes in sod., 2009; Khadari in sod., 2003; Wu in sod., 2004). Prav ta tehnologija je bila uporabljena tudi pri analizi genetske variabilnosti skozi proces indukcije somatske embriogeneze pri *Olea europaea* L. In *Olea europaea* var. *madrensis*. Avtorji poročajo o ohranjanju genomske integritete skozi celoten proces somatske embriogeneze in o odsotnosti somaklonske variabilnosti (Lopes in sod., 2009). Mikrosatelitski markerji so odprli tudi nove vpoglede v genetsko raznolikost in pretok genov med divjimi sortami oljk (*oleaster*) in kultivirano oljko (Breton in sod., 2006).

Od samega začetka uporabe mikrosatelitov se je za detekcijo teh markerjev uporabljala agarozna gelska elektroforeza. Ta metoda je učinkovita, če so aleli dovolj dolgi, to je več kot 200 – 300 baznih parov in so njihove razlike tako očitne, da jih zaznamo pri ločevanju na agaroznem gelu (to je več kot 10-20 baznih parov). Visoko ločljivi poliakrilamidni geli so bili uporabljeni le takrat, ko so želeli odkriti razlike med aleli v velikosti manj kot 1-10 baznih parov. V sedanjem času se v večini laboratorijev uporablja avtomatske sekvenčne naprave, ki so se izkazale za zelo zanesljive in natančne (Gomes in sod., 2012).

2.3 GENETSKE TRANSFORMACIJE PRI OLJKI

Pri žlahtnjenju oljke že vrsto desetletij poteka aktivni program, ki si prizadeva za pridobitev novejših in sodobnih sort, ki bi bile prilagojene na različne stresne razmere. Kljub velikim naporom, pa so sorte, ki so komercialne in izbrane za posamezna območja, lastno delo pridelovalcev, pridobljene skozi stoletja (Rugini in Baldoni, 2005). Razvoj molekulskih markerjev in nadaljne raziskave genoma oljke so že prinesle pozitivne rezultate, v prihodnosti pa bodo pripomogle k samemu žlahtnjenju in implementaciji novih genov, ki bodo predstavljali izboljšanje nekaterih agronomskih lastnosti. Tekom dosedanjih raziskav je bilo odkritih in opisanih kar nekaj genov, ki uravnavajo oziroma vplivajo na odpornost oljke na glive (Benitez in sod., 2005), produktivnost in toleranco na stres (Bruno in sod., 2009) in vplivajo na kakovost olja (Rugini in Baldoni, 2005).

Genetske transformacije predstavljajo dragoceno orodje v žlahtnjenju rastlin, saj omogočajo introdukcijo željenih lastnosti v izbrano sorto. Pri oljki je na področju genetskih transformacij opravljenih le nekaj študij, saj velik problem še vedno predstavlja neodzivnosti oljke pri *in vitro* regeneraciji. Mencuccini in sod. (1999) poročajo o transformaciji listnih pecljev sorte 'Dolce Agogia' z bakterijo *Agrobacterium*, kjer so uspešno pridobili transgeni kalus, vendar pa poganjki niso preživeli na gojišču z dodatkom kanamicina. Rugini in sod. (2000) so uspešno pridobili transgeno rastlino oljke, sorte 'Canino', ki je izražala *rolABC* gen iz bakterije *A. rhizogenes*, z namenom spreminjanja vegetativne rasti. Naslednji pomemben korak je uspel Rugini in sod. (2000) ter D' Angeli in sod. (2007), ko so dosegli, da je prišlo do izražanja gena *osmotin* za povečanje odpornosti na biotski stres.

S preizkušanjem novih metod genetske transformacije so se ukvarjali Lambardi in sod. (1999) ter Pérez-Barranco in sod. (2009), ki so poskušali vzpostaviti uspešno metodo transformacije s pomočjo biolistike somatskih embrijev. V obeh raziskavah so uspešno pridobili transgeni kalus, ki je kazal ekspresijo *GUS* gena, vendar pa postopek regeneracije rastlin ni bil uspešen. Pérez-Barranco in sod. (2007) so razvili učinkovit sistem regeneracije skozi somatsko embriogenezo, kjer so uporabili radikule zrelih zigotskih embrijev pri sorti 'Picual'. Dve leti kasneje pa je bila dosežena tudi toleranca somatskih embrijev na različne aminoglikozidne antibiotike za selekcijo *nptII* gena (Pérez-Barranco in sod., 2009).

2.3.1 Transformacije z dostavnimi peptidi

Dostavni peptidi (angl. Cell Penetrating Peptides-CPPs), so kratki peptidi, sestavljeni iz manj kot 30-ih aminokislin in imajo zmožnost vstopati skozi celično membrano.

Pred skoraj 20 leti se je raziskovanje njihove uporabe začelo predvsem za namen prenosa makromolekul v živalske celice. Kasneje je bil ta sistem uporabljen tudi v farmaciji, za prenos različnih učinkovin. Nedavno je bila njihova uporabnost raziskana tudi pri dostavljanju makromolekul v rastlinske celice, kjer imajo vlogo nanoprenašalcev. Premostitev

bariere celične membrane z dostavnimi peptidi tako odpira nove možnosti za transformacije in razvoj rastlinske biotehnologije (Eudes in sod., 2008).

Strukturne in funkcijske študije dostavnih peptidov so bile najprej raziskane v živalskih celicah. Pri rastlinskih celicah pa je ravno to področje še precej neznano oziroma neraziskano. O celični internalizaciji dostavnih peptidov, kot je *p*VEC, transportan, monomer in dimer HIV-1, Tat peptid ter penetratin so poročali pri protoplastih tobaka, pridobljenih iz celične suspenzije in pri mezofilnih protoplastih tritikale (Mae in sod., 2005; Chugh in sod., 2007; Chang in sod., 2005). Pri tritikali je bila v teh študijah dokazana visoka stopnja internalizacije *p*VEC in transportana v listnih meristemih in na koreninah.

Tat₄₉₋₅₇ RKKRRQRRR, znan kot najkrajši dostavni peptid, lahko neodvisno vstopa skozi celično membrano ter se akumulira v celičnem jedru (Chugh in sod., 2007). Tat in njegovi oligomeri lahko na tak način, s pomočjo makropinocitoze preidejo v celico s celim kompleksom makromolekul, ki imajo nekajkrat večjo molekulska maso kot peptidi sami (Chang in sod., 2007).

Predpogoj za uspešno translokacijo teh nanoprenašalcev ter njihovega kompleksa makromolekul pa je permeabilizacijska sposobnost celične stene. Wu in sod. (2003) so raziskovali sposobnost dostavnih peptidov za prenos velikih proteinov v celico, kjer so ugotovili, da so Tat monomeri (Tat) in dimeri (Tat₂) sposobni prenosa velikega proteina β -glukuronidaze (GUS, z molekulska maso 270 kDa). Poročajo tudi o bolj intenzivni modri obarvanosti celic, ko so nezrele embrije pšenice pred transformacijo tretirali s posebnimi peptidi, ki so znani pod komercialnim imenom Chariot kit.

2.3.2 Uporaba ionizirajočega sevanja v žlahtnjenju rastlin

Zgodovina uporabe induciranih mutacij v žlahtnjenju rastlin sega v leto 1941, ko je švedski genetik Åke Gustafsson (Gustafsson in sod., 1941) med prvimi vzpostavil protokol izzivanja mutacij pri rastlinah. Skoraj 20 let kasneje, v 60-ih letih prejšnjega stoletja je v okviru združenja FAO/IAEA v Rimu potekalo srečanje vseh vodilnih znanstvenikov na tem področju, kjer so razpravljali o smotni uporabi sevanja za namen pridobivanja mutacij ter o poplavi publikacij v tistem času, ki so govorile o neomejenih možnostih uporabe sevanja v namen žlahtnjenja rastlin, ki naj bi pomenile povečanje uporabe omenjene tehnike v prihodnosti ter pridobitev velikega števila novih sort. Vendar pa temu ni bilo tako. Razvoj uporabe sevanja za izzivanje mutacij je zastal, največji razlog pa lahko pripišemo uporabi prevelikih doz sevanja, ki so prispevale k majhnemu deležu zaželjenih mutacij, oziroma izoliranih mutantov, posledično pa je bilo na trg uvedenih zelo malo novih sort. Selekcija mutantov je bila težavna tudi zaradi pomanjkanja učinkovitih orodij za ugotavljanje mutacij. S tem je pomen žlahtnjenja s sevanjem pridobil povsem negativen pomen. V svetu je bilo opravljenih nešteto poskusov za pridobivanje novih in novih mutacij, vendar pa je bilo število novih registriranih sort zanemarljivo majhno (Maluszynski, 2001).

Večji napredek v pridobivanju novih sort se je zgodil v letu 1975, ko je bilo na trg uvedenih 205 novih sort. Prvi novi mutant sorte tobaka, 'Clorina F1', najverjetneje pridobljen z uporabo X-žarkov, je bil prijavljen v Indoneziji, že v letu 1934. Naslednji znan mutant, pridobljen s postopki obsevanja pa je bil na trg uveden skoraj 15 let pozneje, v letu 1948. Šlo je za bombaž, sorto 'M.A.9', ki je bila razvita v Indiji (Maluszynski, 2001).

Uradno zbiranje podatkov o novih uvedenih sortah se je pričelo v letu 1963 s strani FAO/IAEA (FAO-Food and Agriculture Organization iz Združenih narodov; IAEA-International Atomic Energy Agency). Tako so nadaljnjih 22 let zbirali vse podatke o novih mutantih. V 80ih letih prejšnjega stoletja pa je število novih sort pričelo bliskovito naraščati in je zbiranje vseh podatkov ter opisovanje novih mutantov postalo nemogoče. S tem namenom je bila kasneje ustanovljena internetna baza MVD (Mutation Varieties Database) za avtomatsko zbiranje podatkov, ki je leta 2000 vsebovala prek 2252 novih variacij sort (Maluszynski, 2001).

Pojem 'žlahtnjenje rastlin s postopki izzivanja mutacij' je v sedanjem času postal preozek za opis vseh možnosti, ki jih ponuja, zato so znanstveniki odobrili nov termin, ki opisuje vse zgoraj omenjeno: 'tehnike mutacij' v žlahtnjenju rastlin in bazične raziskave. Nedaven razvoj tkivnih kultur in uporabe molekulskih markerjev pa je uporabi teh tehnik dodal nove dimenzije, ki v prihodnosti predstavljajo uporabna orodja za pridobivanje in zaznavanje mutacij (Maluszynski, 2001).

Pri obsevanju rastlinskega materiala je najpomembnejša doza oziroma količina sevanja, ki je skupek sevalne energije, ki se absorbira v tkivu. Enota, s katero merimo sevanje se imenuje Gray (Gy). En Gy je enak absorpciji 1 J energije na kilogram obsevane snovi. Doze sevanja pa tako delimo na tri glavne kategorije: visoka (> 10 kGy), srednja (1 do 10 kGy) in nizka (< 1 kGy). Obsevanje rastlinskih tkiv z ionizirajočim sevanjem, kamor spadajo X-žarki, gama žarki in neutroni je precej dobro raziskano. Izzvane mutacije so se uporabljale že davno nazaj, predvsem za izboljšanje zanimivih agonomskih lastnosti glavnih svetovnih poljščin, kot so pšenica, riž, ječmen, arašid in fižol, ki se razmnožujejo s semenom. Velike doze sevanja se uporabljajo za sterilizacijo prehrabnenih izdelkov, nizke doze pa za izzivanje mutacij v semenskem materialu, kjer uporabljene doze variirajo od 60 do 700 Gy za večino s semenom razmnoženih poljščin. V primeru obsevanja rastlinskega materiala *in vitro*, kjer je le nekaj miligramov tkiva, pa se doze obsevanja močno znižajo. V nekaterih člankih poročajo, naj bi bila kultura kalusa zelo občutljiva na sevanje, in je doza sevanja precej nižja (2 do 5 Gy) v primerjavi z obsevanjem stebeljnih poganjkov ali semen. Pri obsevanju z relativno visokimi dozami (15 do 20 Gy) pa tkivo postane nekrotično ali pa izgubi regenerativno sposobnost (Ahloowalia in sod., 2001).

Izzvane mutacije pri navadnem repnjakovcu (*Arabidopsis thaliana*), koruzi, ječmenu, grahu in tobaku so bile uporabljene za izolacijo in identifikacijo genov, ki sodelujejo pri regulaciji razvoja rastline, razvoju cvetnih zasnov, semenskega razvoja ter razvoju in porjavitvi plodov. Identifikacija in analiza mutantov temelji na uporabi molekularnih tehnik iskanja prstnih odtisov DNA in kartiranja ter PCR markerjev, kamor sodijo RAPD, AFLP in mikrosateliti (Ahloowalia in sod., 2001).

Ionizirno sevanje nastane, ko je energija žarkov tako velika, da žarek v atomu izbije elektron in tako ionizira atom – atom se spremeni v ion (Adler, 1973). Gostota ionizacij, ki jih povzročajo sevanje ali delci, je zelo različna. Na splošno rentgenski (X-žarki) ali gama žarki povzročajo redke ionizacije, elektroni gostejše, nevtroni pa zelo goste ionizacije.

Uporaba ionizirnih sevanj, kot so rentgenski žarki, gama žarki, nevtroni in kemični mutageni, za induciranje sprememb je že dolgo poznana in dobro vpeljana. Takšne mutacije se uporabljajo za izboljšanje pomembnih kultur, kot so pšenica, riž, ječmen, bombaž, arašid, fižol in druge rastline, ki se razmnožujejo s semeni (Ahloowalia in sod., 2000). Tretiranje rastlin z mutageni lahko povzroči primarne – fiziološke poškodbe in poškodbe dednega materiala. Primarne poškodbe so večinoma značilne v prvi generaciji, medtem ko se poškodbe dednega materiala z dedovanjem prenesejo na naslednje generacije. Fiziološke poškodbe se lahko pojavljajo na posameznih delih rastline, ali pa so razporejene po celi rastlini in se opazijo kot zavirana rast ali celo odmrtnost rastline. Vzroki primarnih poškodb so lahko kromosomske ali nekromosomske narave, kar pa je običajno težko razločiti.

Od odkritja X-žarkov, v letu 1895 (Röntgen), je bilo o njihovi značilnosti in uporabi narejenih ogromno raziskav. Najprej so se žarki uporabljali v klinični diagnostiki in terapiji, in prav zaradi tega se je pričela množična raziskava o njihovem vplivu na žive organizme. V začetni fazi odkrivanja vpliva X-žarkov na rastline se je razširilo splošno mnenje, da majhne doze tega sevanja stimulirajo rast rastlin in povečujejo pridelek, a nadaljnjih raziskav, ki bi potrdile to hipotezo je bilo zelo malo. O manjšem povečanju pridelka z uporabo X-žarkov so poročali pri raziskavah, opravljenih na krompirju v raziskovalnem centru za kmetijstvo v New Jerseyu (Edna Louise Johnson, 1928). Možnost stimulativnih učinkov sevanja skozi tisti čas, kot ugotavljajo Charles in sod. (1933) ni bila zaznana prav zaradi visokih sevalnih doz in zaradi visokega deleža dolgovalovnega sevanja, ki ga oddajajo X-žarki. Škodljivi učinki sevanja pa so zaznani pri vseh raziskavah, v katerih niso uporabljali filtriranega sevanja. Avtorji tudi poudarjajo, da bi stimulativne učinke sevanja lahko dosegli z dosledno uporabo kovinskih plošč v sevalnih napravah, ki korenito vplivajo na sestavo dolgovalovnega sevanja. Poleg zmanjšane intenzitete vsake valovne dolžine spektra X-žarkov, se spremeni tudi relativni delež prejete energije za vsako valovno dolžino sevalnega spektra. Krajše valovne dolžine sevanja se manj absorbirajo kot dolgovalovno sevanje, kar v praksi dosežemo z uporabo aluminijastih ali bakrenih filtrov, ki močno absorbirajo najdaljše valovne dolžine sevanja X-žarkov in jih praktično odstranijo iz sevalnega spektra.

O vplivih sevanja na oljko je bilo do sedaj opravljenih le nekaj raziskav. Donini in sod. (1972) poročajo o uspešno izzvanih mutacijah na ukoreninjenih potaknjencih oljke, kjer so potaknjence sort 'Ascolana' in 'Moraiolo' izpostavili sevalni dozi 40 Gy, kot vir sevanja pa so bili uporabljeni gama žarki. Ta raziskava je bila ključna, da so leta 1982 (Donini in sod., 1982) uspešno registrirali novo sorto po imenu 'Briscola'. Sorta je bila pridobljena z obsevanjem dormantnih brstov sorte 'Ascolana', kjer so uporabili gama žarke s sevalno dozo 40 Gy. Pridobljena nova sorta je bila opisana kot zelo dobra, s kompaktno rastjo in zgodnjim cvetenjem ter zgodnjo produkcijo plodov, in je še danes precej zastopana sorta v oljčnikih.

O vplivu različnih doz sevanja na DNA oljke je bilo narejenih zelo malo raziskav. Rawashdeh in sod. (2003) so za namen odkrivanja genetskih variacij pri mutantih uporabili tehniko RAPD. Mutanti so bili pridobljeni z uporabo različnih doz sevanja gama žarkov (20, 30 in 40 Gy), s katerimi so obsevali poteknjence, sledila pa je analiza DNA z dvajsetimi oligonukleotidnimi začetniki RAPD, ki je pokazala majhen odstotek polimorfizma v primerjavi s kontrolo.

Veliko več študij o vplivu sevanja na nivoju DNA je bilo narejenih pri drugih vrstah, kar potrjuje uporabnost molekulskih metod za detekcijo polimorfizma (Atienzar in sod., 2002). V področje tovrstnih raziskav je bilo vključenih veliko vrst, denimo breskev (Hashmi in sod., 1997), soja (Gesteira in sod., 2002), hmelj (Patzak, 2003), dateljnova palma (Saker in sod., 2006) in riž (Rashid in sod., 2009).

2.3.3 Endofitske glive

Endofitske glive so definirane kot mikroorganizmi, ki naseljujejo zdravo tkivo rastline inter in/ali intracelularno, v enem ali več obdobjih življenjskega cikla rastline, brez bolezenskih simptomov gostitelja (Sakalidis in sod., 2011).

Značilno je, da endofiti naseljujejo gostitelja in lahko ne povzročajo nobene škode, vendar pa je podroben opis o vplivu endofitskih gliv na rastline zelo kompleksen in tako težko poenoten za vse rastlinske vrste enako. Prisotnost in pomen endofitskih gliv v lesnatih rastlinah ni popolnoma pojasnjena, vendar pa obstaja veliko načinov, kako le te vplivajo na rast rastlin. Raziskave o endofitskih glivah so zato pomembne, saj lahko endofitske glive sodelujejo tudi pri pridobivanju sekundarnih metabolitov ali pa služijo kot vektorji za vnos genov, ki lahko zagotavljajo odpornost na škodljivce ali izrazijo druge pomembne lastnosti (Strobel, 2003).

Največ raziskav, povezanih z endofitskimi glivami, je bilo opravljenih na rastlinah ki izhajajo iz zmerne podnebne pasu, v zadnjem času pa so bile mnoge identificirane tudi pri nekaterih rastlinah iz tropskega pasu.

Prisotnost endofitskih gliv so preučevali pri številnih drevesnih vrstah. Študije poročajo o pojavljanju podobnih endofitskih gliv pri banani, kakavovcu, limoni in drugih gospodarsko pomembnih vrstah. V splošnem velja, da prisotnost endofitov ne povzroča bistvenih težav, vendar pa raziskovalci poročajo, da so nekatere endofitske glive sčasoma pridobile patogene lastnosti (Thomma, 2003). Za vrste gliv, iz skupine *Alternaria*, je denimo značilno, da napadejo in parazitizirajo semena različnih rastlinskih vrst in s tem lahko povzročijo veliko gospodarsko škodo. To vrsto endofitskih gliv so Chobba in sod. (2013) izolirali iz zdravih dreves palme v letu 2010. Zaključujejo, da je pri izoliranih endofitih potrebna previdnost, saj se lahko ob različnih stresnih dejavnikih glive odzovejo drugače in kot že omenjeno, pridobijo patogene lastnosti.

Oses in sod. (2008) so preučevali prisotnost endofitskih gliv v ksilemu zdravih dreves čilškega bora in posledično njihov patogen učinek. Potrdili so hipotezo, da prisotnost endofitskih gliv v ksilemu zdravih dreves podpira hipotezo latentne infekcije, ki temelji na tem, da so endofitske glive lahko vzrok za razpadanje lesa v določenem življenjskem ciklu rastline. Iz zdravih dreves so omenjeni raziskovalci izolirali endofitske glive iz družine *basidiomycetes* in *ascomycetes*, ki so v literaturi opisane kot glavne povzročiteljice pričetka razpadanja lesa. Endofite so preučevali tudi z natančnim pregledom tkiva pod elektronskim mikroskopom in tako potrdili prisotnost v ksilemu in razširjanjem omenjenih gliv tudi na druga tkiva. Svojo raziskavo zaključujejo z ugotovitvijo, da so nekateri endofitski mikroorganizmi, potencialno patogeni, bolezen pa se lahko razvije samo v kombinaciji z drugim, večinoma neznanim sprožilcem te bolezni.

O okuževanju *in vitro* izsečkov ter identifikaciji gliv obstaja le nekaj raziskav. Med zadnje raziskave na omenjenem področju sodi delo Omamor in sod. (2007), ki so v tkivni kulturi oljne palme identificirali 25 endofitskih gliv, ter preučevali njihove posledice. Največ endofitskih gliv so identificirali pri *in vitro* izsečkih listov, največ kontaminantov pa je pripadalo rodovom gliv *Cladosporium*, *Curvularia*, *Aspergillus*, *Penicillium* in *Alternaria*. Avtorji zaključujejo, da so identificirani endofiti glavni vzrok za propad tkivne kulture, saj v gojišču izrabljajo hranila in prerastejo celotno površino izsečka.

Pri oljki se raziskave o vplivu endofitskih gliv na rast in razvoj dreves, osredotočajo predvsem na glivo *Verticillium dahliae*, ki je v nekaterih državah, ki so velike pridelovalke olja (Španija, Grčija), v oljčnikih že povzročila veliko gospodarsko škodo. Zadnja raziskava, ki govori o prisotnosti tudi drugih endofitskih gliv je bila objavljena v letu 2012. Sanei in Razavi (2012) sta z zbiranjem okuženih vzorcev mladih dreves med letoma 2004 in 2009, na območju Irana, uspešno ovrednotila in identificirala endofitske glive ter preučila njihov nadaljni pomen. Poleg najbolj izstopajoče glive *Verticillium dahliae* in *Fusicladium oea-gium*, sta uspešno identificirala še 21 vrst drugih gliv. Avtorji v svojem delu podrobno opisujejo bolezni, ki jih povzročajo identificirane endofitske glive in zaključujejo, da so najverjetneje glavni razlog za propad velikih območij novejših nasadov oljk v starosti od 2 do 5 let in je podatek pomemben za razvoj novih metod eliminacije gliv v mladih drevesih oljk.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 VZPOSTAVITEV TKIVNE KULTURE 'ISTRSKE BELICE' *in vitro*

3.1.1 Izbira donorskih rastlin

Za donorske rastline smo izbrali mlada drevesa oljk sorte 'Istrska belica', stara približno 4 leta, ki smo jih kupili leta 2008 in so bile vzgojene v Centru za razmnoževanje oljke na Purisimi v Ankaranu. Rastline so bile tekom raziskave nameščene in vzdrževane v steklenjaku Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete v Ljubljani. Rastline so rasle pri minimalni nočni temperaturi 15 ± 2 °C in maksimalni dnevni temperaturi 25 ± 2 °C s 16 urno fotoperiodo. Po potrebi smo rastline osvetljevali s pomočjo 600 W natrijevih visokotlačnih svetilk (Hortilux Schreder HPS 600 W/400 V). Za primerjavo v odzivnosti tkiv iz različnih donorskih rastlin, smo izbrali tudi rastlinski material iz nasada v kraju Osp, kjer so matične rastline rastle v oljčniku in so bile starosti približno 12 let.

3.1.2 Inicijacija tkivne kulture

Za vzpostavitev tkivne kulture smo vsako leto v začetku marca uporabili enoletne poganjke donorskih rastlin. Enoletnim poganjkom smo nato ročno odstranili liste in listne peclje ter poganjke razrezali na 3 cm velike izsečke, ki so vsebovali po dva zalistna brsta (nodije) (Slika 2).



Slika 2: Prikaz razreza nodijskih izsečkov iz enoletnih poganjkov sorte 'Istrska belica'

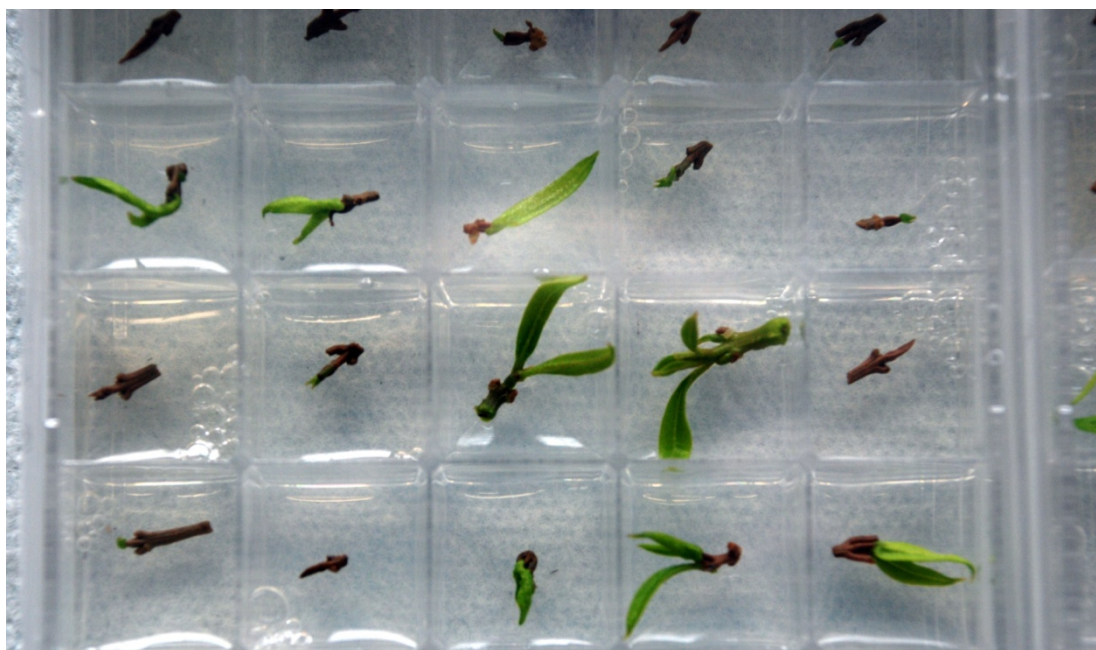
Figure 2: Uninodal segments from one-year old brunch used in tissue culture initiation of cultivar 'Istrska belica'

Omenjen postopek je potekal v rastlinjaku, kjer smo odrezane poganjke takoj potopili v svežo vodo, da smo se izognili izsušitvi. Razrezane poganjke oziroma nodijske izsečke smo nato prenesli v laboratorij, kjer smo jih približno eno uro spirali pod tekočo vodo. Po končanem spiranju smo izsečke previdno prestavili v naprej pripravljeno raztopino askorbinske in citronske kisline, v razmerju (20:200 mg/l) za eno uro. Sledil je postopek sterilizacije z etanolom, kjer smo nodije za eno minuto potopili v raztopino 70 % etanola (Sigma). Po pretečenem času smo nodijske izsečke sterilizirali 15 minut v 1,66 % dikloroizocianurni kislini natrijeve soli (DICA) (Sigma, Saint Louis, ZDA) z dodatkom treh kapljic močila Tween-20 (Sigma). V celotnem postopku razkuževanja smo uporabili tudi magnetno mešalo, ki je z neprestanim mešanjem poskrbelo za boljši učinek samega razkuževanja, delo pa je potekalo v komori za aseptično delo. Po pretečenem času zadnje stopnje sterilizacije smo nodijske izsečke še trikrat sprali s sterilno vodo ter jih prestavili na izbrano gojišče, ki je bilo predhodno pripravljeno v posebnih posodah namenjenih tkivni kulturi (Slika 3).

Za vzpostavitev tkivne kulture smo izbrali 2 komercialno pripravljena gojišča, in sicer OM (Olive Medium) (Rugini, 1984) (Duchefa) gojišče, in pa gojišče DKW (Driver and Kuniyuki, 1981) (Duchefa), katerima smo dodali 33 g/l manitola in 7 g/l agarja, pH pa umerili na vrednost 6,0. Gojišča smo avtoklavirali 20 minut pri 121 °C. Po avtoklaviranju je sledilo še sterilno dodajanje citokininov. Za citokinine smo izbrali zeatin ribozid (Sigma) in δ^2 -izopentenil adenin (2iP) (Sigma). Vsak je bil dodan k avtoklaviranemu gojišču ločeno v koncentraciji 4 mg/l. Za preizkušanje optimalnega iniciacijskega gojišča smo tako uporabili 4 različna gojišča in sicer:

- gojišče OM s 4 mg/l zeatin ribozida ,
- gojišče OM s 4 mg/l 2iP,
- gojišče DKW s 4 mg/l zeatin ribozida in
- gojišče DKW s 4 mg/l 2iP

Rastlinski material smo gojili v 600 litrskih rastnih komorah pri temperaturi 23 ± 1 °C ob 16 urni fotoperiodi in osvetlitvi 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ oz. v temi.



Slika 3: Apikalni in terminalni nodiji namenjeni vzpostavitvi tkivne kulture 'Istrske belice'

Figure 3: Apical and terminal nodes for tissue culture initiation of cultivar 'Istrska belica'

3.1.3 Izdolževanje poganjkov

Po enem mesecu smo nodijske izsečke, ki smo jih nastavili v gojišče z namenom iniciacije tkivne kulture, po opisanem postopku v točki 3.1.2, podrobno pregledali ter ugotovili kateri so primerni za predstavitev na novo gojišče za izdolževanje poganjkov. Nodije, ki so odgnali nove poganjke in so bili le-ti dolgi več kot 3 cm, smo v aseptični komori prestavili na gojišče za izdolževanje poganjkov. Osnovno gojišče za izdolževanje poganjkov je bilo enako kot v točki 3.1.2, le da smo po avtoklaviranju dodali citokinine v spremenjeni koncentraciji in gibereline. Po avtoklaviranju smo v osnovna gojišča, opisana v točki 3.1.2, filtersko dodali zeatin ribozid, v koncentraciji 4,8 mg/l in giberelinsko kislino (GA3) v koncentraciji 1,49 mg/l. Za preizkušanje optimalnega gojišča za izdolževanje poganjkov smo pripravili 4 gojišča in sicer:

- gojišče OM s 4,8 mg/l zeatin ribozida in 1,49 mg/l GA3,
- gojišče OM s 4,8 mg/l 2iP in 1,49 mg/l GA3,
- gojišče DKW s 4,8 mg/l zeatin ribozida in 1,49 mg/l GA3 in
- gojišče DKW s 4,8 mg/l 2iP in 1,49 mg/l GA3

Rastlinski material smo gojili v 600 litrskih rastnih komorah pri temperaturi 23 ± 1 °C ob 16 urni fotoperiodi in osvetlitvi 40 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ oz. v temi. Faza izdolževanja je trajala približno mesec in pol.

3.1.4 Razmnoževanje poganjkov *in vitro*

Po zaključeni fazi izdolževanja poganjkov, ki je opisana v točki 3.1.3, smo novo nastale *in vitro* poganjke v aseptični komori razrezali na nodijske izsečke, velikosti 2 cm, ter jih predstavili na gojišče za razmnoževanje poganjkov. Gojišče za razmnoževanje smo pripravili iz komercialnega pripravka za gojišče OM (Duchefa), manitola v koncentraciji 36 g/l, agarja v koncentraciji 7 g/l, pH pa je bil umerjen na vrednost 5,8. Po avtoklaviranju smo gojišču dodali še filtrsko sterilizirane rastne hormone in sicer zeatin ribozid v koncentraciji 2 mg/l in giberelinsko kislino (GA_3) v koncentraciji 1 mg/l. Rastlinski material smo gojili v 600 litrskih rastnih komorah pri temperaturi 23 ± 1 °C ob 16 urni fotoperiodi in osvetlitvi 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ oz. v temi.

3.1.5 Preverjanje endogenih okužb

Za ugotavljanje morebitnih endofitsko prisotnih mikroorganizmov smo izbrali *in vitro* nodijske izsečke sorte 'Istrska belica', ki so rastli v tkivni kulturi mesec dni. Omenjene izsečke smo v aseptičnih pogojih vzdolžno prerezali ter položili na gojišče za detekcijo gliv, SABAURAUD, ki je sestavljeno iz naslednjih sestavin:

- pepton iz kazeina (5 g/l)
- mesni pepton (5 g/l)
- dekstroza (40 g/l)
- agar (17 g/l), pH vrednost smo umerili na 5,5.

Po uspešni razmnožitvi gliv, smo omenjene razrasle glive v aseptičnih pogojih prenesli v tekoče gojišče, ki je bilo identično prvemu, le da ni bilo dodanega agarja. Tako smo na stresalniku (120 obratov/ minuto) gojili 10 različnih vrst gliv in po enem mesecu pričeli z izolacijo DNA.

Izolacijo nepoznanih gliv smo izvedli po protokolu za izolacijo rastlinske DNA, ki je opisan v točki 3.3.2. Koncentracijo DNA pa smo izmerili po postopku, ki je opisan v točki 3.3.3. Za identifikacijo gliv smo s PCR tehniko namnožili ITS (ang. Internal Transcribed Spacer) regije. Za sekvenčno reakcijo smo uporabili markerje ITS 1, ITS 4 in ITS 5 markerje. Za izvedbo PCR-ja smo tako pripravili dve ločeni Eppendorf tubici, ki sta vsebovali kombinacijo različnih začetnih oligonukleotidov in ustrezne koncentracije PCR pufra, MgCl_2 , dNTPjev in *Taq* polimeraze. Prva Eppendorf tubica, z oznako Mix1 je vsebovala: DNA glive (10 ng/), 10-kratni PCR pufer, 25 mM MgCl_2 , 10 mM dNTP, začetne oligonukleotide ITS1-FOR, ITS4-REV, *Taq* polimerazo (5U/ μl) in pa vodo do končnega volumna 50 μl . Druga Eppendorf tubica, z oznako Mix2, je vsebovala identične raztopine in koncentracije PCR raztopin, le da so bili kot začetni oligonukleotidi uporabljeni ITS5-FOR in ITS4-REV.

Izvedli smo PCR pa naslednjem temperaturnem profilu:

- 95 °C za pet minu
 - 95 °C za 30 sekund
 - 52 °C za eno minuto
 - 72 °C za eno minuto
 - 72 °C za pet minut
 - 4 °C, ohlajanje vzorcev
- } Cikel se ponovi 30-krat

Verižni reakciji s polimerazo je sledilo čiščenje PCR produktov, kjer smo z uporabo kita ExoSap-IT (USB[®]) in encima alkalne fosfataze (FAST-AP) (USB[®]) odstranili začetne in nevgrajene nukleotide in razgradili preostale nukleotide. Za omenjeno reakcijo PCR, smo od predhodne reakcije odvzeli 5 µl PCR produktov, vsakemu vzorcu dodali 1X PCR pufer, 5,5 µl FAST-AP in 1,1 µl ExoSapI, ter vzorce najprej inkubirali 45 minut na 37 °C in nato še 15 minut na 80 °C. Tako očiščene PCR produkte smo nato uporabili v sekvenčni reakciji, kjer smo kot izhodiščno DNA odvzeli 3,5 µl očiščenih PCR produktov za vsak vzorec posebej. Zopet smo ločeno pripravili 3 epice, ki so vsebovale identične reakcijske raztopine, vendar različne začetne oligonukleotide. Prva epica je vsebovala 3,5 µl DNA, 10 µl vode, 5X BigDye pufer (USB), 1 µl BigDye (USB) in začetni oligonukleotid ITS1-FOR. Druga epica je bila identična prvi, le da je vsebovala začetni oligonukleotid ITS4-REV, prav tako tretja epica z začetnim oligonukleotidom ITS5-FOR. Sekvenčna reakcija je bila izvedena po naslednjem temperaturnem profilu PCR:

- 96 °C začetna denaturacija, tri minute, enkratna ponovitev
 - 96 °C denaturacija, deset sekund,
 - 50 °C prileganje začetnih oligonukleotidov, deset sekund,
 - 60 °C sinteza fragmentov DNA, štiri minute,
 - 72 °C končno izdolževanje fragmentov, sedem minut, enkratna ponovitev
 - 4 v, hlajenje
- } Cikel se ponovi 99-krat

Po končani sekvenčni reakciji je sledilo še čiščenje omenjene reakcije, ki smo ga izvedli z dodajanjem 2,5 µl 125 mM EDTA in 30 µl absolutnega etanola v vsak vzorec. Tako pripravljene vzorce smo nato centrifugirali za 55 minut na 4 °C, ter po končanem centrifugiranju dodali še 12 µl formamida in vzorce poslali na analizo. Analiza je potekala na avtomatskem sekvenatorju ABI 3130xl Genetic Analyzer.

3.2 OBSEVANJE *in vitro* RASTLIN OLJKE SORTE 'CANINO' Z X-ŽARKI

3.2.1 Rastlinski material

Vzorec tkivne kulture *in vitro* sorte 'Canino' smo leta 2008 prejeli v dar od prof. dr. E. Rugini-ja, ob obisku fakultete za agronomijo v Viterbu, Italija. Omenjen vzorec smo od

leta 2008 razmnoževali na gojišču za razmnoževanje, opisanem v točki 3.1.4. Rastlinski material smo gojili v 600 litrskih rastnih komorah pri temperaturi 23 ± 1 °C ob 16 urni fotoperiodi in osvetlitvi 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ oz. v temi. Rastline so *in vitro* lepo uspevale in smo tekom let pridobili veliko rastlinskega materiala, ki smo ga potrebovali za izvedbo obsevanja *in vitro* kulture. Za namen obsevanja smo uporabili mlade poganjke *in vitro* kulture stare mesec dni, skupaj pa je bilo obsevanih 1017 nodijskih izsečkov.

3.2.2 Obsevanje z X-žarki

Za obsevanje smo *in vitro* poganjke sorte 'Canino' v aseptični komori predstavili v petrijevke. Petrijevke z omenjenim materialom smo nato prenesli v komoro za obsevanje z X-žarki. Obsevanje smo opravili na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin, na napravi Faxitron RX-650 (Faxitron bioptics LLC, Tuscon, USA). Za namen preučevanja različnih doz sevanja smo uporabili tri različne doze: 10 Gy (Grey), 30 Gy, 60 Gy in pa kontrola z 0 Gy. Enake doze sevanja so bile uporabljene tudi pri vzporednem poskusu za ovrednotenje vpliva aluminijaste folije, ki naj bi dvignila energijo fotonov. Za ta namen smo v notranjosti komore, tik pod izvirom sevanja namestili 0,5 mm debelo plast aluminijaste folije. Po končanem obsevanju so bili poganjki v sterilnih pogojih razrezani na enake dele - nodije, velikosti približno 2 cm. Skupno smo obsevali 1017 nodijev, 461 nodijev je bilo obsevanih z aluminijasto folijo, 556 nodijev pa brez aluminijaste folije. Obsevani nodijski izsečki so bili nato predstavljeni na gojišče za razmnoževanje, kot je opisano v točki 3.1.4 in predstavljeni v rastno komoro s temperaturo 23 ± 1 °C in 16 urno fotoperiodo in osvetlitvijo 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ oz. v temi.

3.2.3 Morfološke meritve obsevanih tkiv

Morfološke meritve obsevanih nodijskih izsečkov smo opravili 1 mesec po obsevanju. Novonastale poganjke smo izmerili, stehali, ter po fazi koreninjenja opravili še pregled ukoreninjenih rastlin pred aklimatizacijo.

3.2.4 Koreninjenje in aklimatizacija

Po opravljenih morfoloških meritvah smo obsevane poganjke predstavili na gojišče za koreninjenje. Gojišče za koreninjenje je bilo sestavljeno iz ¼ MS (Murashige, Skoog, 1964), 25 g/l saharoze, 1 mg/l IBA (indol-3-maslena kislina), 50 mg/l mioinozitola, 7g/l agarja ter pH vrednost umerjena na 5,8. Gojišče smo razdelili v steklene epruvete z 10 ml gojišča/epruveto ter jih zaprli s plastičnimi zamaški in zalepili s Parafilmom®. Koreninjenje je potekalo v rastnih komorah s temperaturo 23 ± 1 °C in 16 urno fotoperiodo in osvetlitvijo 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ oz. v temi. Čas koreninjenja je bil odvisen od velikosti poganjka pred koreninjenjem, vendar je celotna doba koreninjenja trajala približno 2 mesca. Po preteku tega obdobja smo dokončali morfološke meritve kot je opisano v točki 3.2.3 in tabeli dodali še vrednosti ukoreninjenih oljk.

Aklimatizacija je potekala v steklenjaku Oddelka za agronomijo na Biotehniški fakulteti. Ukoreninjenje *in vitro* rastline oljk smo posadili v plastične mini rastlinjake v mešanico substrata za sajenje in perlita. Pokrite plastične mini rastlinjake smo postavili na pomične sadilne mize v steklenjaku, kjer so rastline rastle v pogojih z minimalno nočno temperaturo 15 ± 2 °C in maksimalno dnevno temperaturo 25 ± 2 °C s 16 urno fotoperiodo. Po potrebi smo rastline osvetljevali s pomočjo 600 W natrijevih visokotlačnih svetilk (Hortilux Schreder HPS 600 W/400V).

3.2.5 Merjenje velikosti genoma s pretočno citometrijo

Za merjenje velikosti genoma smo uporabili mlade liste 19-ih aklimatiziranih in ukoreninjenih obsevanih oljk sorte 'Canino', ki so 6 mesecev rastle v steklenjaku. Za oceno velikosti genoma smo uporabili pretočno citometrijo izoliranih jeder, ki smo jih obarvali s propidijevim jodidom (PI), po znanem protokolu Doležela in sod. (1991). Mlade liste oljk smo v majhni petrijevki z ostro britvico sesekljali skupaj z listi graha (*Pisum sativum* cv. Kleine Rheinländerin) in dodali 1 mililiter LB01 pufra (Doležel in sod., 1989). Suspenzijo sproščenih jeder smo nato prefiltrirali skozi 10 µm najlonsko cedilo in filtratu dodali 50 µg/ml propidijevega jodida in 50 µg/ml ribonukleaze. Meritve smo opravili na pretočnem citometru Partec CyFlow Space z uporabo linearne skale. Velikost genoma smo ocenili glede na pozicijo vrhov G0/G1.

3.3 AFLP METODA

3.3.1 Rastlinski material

Za namen odkrivanja mutacij z metodo AFLP, smo uporabili 23 obsevanih in ukoreninjenih oljk sorte 'Canino', ki so rasle v steklenjaku.

3.3.2 Izolacija DNA

Celokupno DNA smo izolirali iz svežih listov rastlin opisanih v točki 3.3.1. Izolacijo smo izvedli po modificirani CTAB metodi (Kump in sod., 1992). Rastlinsko tkivo smo homogenizirali v terilnici ob dodatku 1 ml CTAB ekstrakcijskega pufra, segretega na 68 °C (2 % (w/v) CTAB (Sigma), 1,4 M NaCl (Merck), 20 mM EDTA (Alkaloid) pH 8,0, 100mM Tris-HCl (Sigma) pH 8,0 in 0,2 % (v/v) β-merkaptetanol (Fluka AG)). Nastalo suspenzijo smo prelili v 2 ml mikrocentrifugirko in inkubirali v vodni kopeli 2 uri pri 68 °C. Nato smo dodali 500 µl topila kloroform: izoamilalkohol v razmerju 24:1, dobro premešali in centrifugirali pri 4 °C 10 minut pri 11.000 obratih na minuto (centrifuga Eppendorf). Supernatant smo odpipetirali v novo mikrocentrifugirko in dodali 1/10 volumna 3 M Na-acetata (pH 5,2, uravnan z očetno kislino) in 1 volumen ledeno hladnega izopropanola (Merck) ter dobro premešali. Vzorce smo inkubirali 30 minut pri -20 °C in ponovno centrifugirali 10 minut pri 11.000 obratih na minuto. Po centrifugiranju smo odlili supernatant, dodali 500

μl 70 % etanola (Merck) in rahlo premešali. Po 20-ih minutah smo etanol previdno odpipetirali in DNA zračno posušili na dnu mikrocentrifugirk. DNA smo raztopili v 50 μl TE pufra (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0), premešali in vzorce shranili do analize v hladilniku pri 4 °C.

3.3.3 Merjenje koncentracije DNA

Koncentracijo izolirane DNA smo izmerili z DNA fluorometrom Hoefer DyNA QuantTM 200 (GE Healthcare, Little Chalfont, Velika Britanija). Pri merjenju koncentracije smo uporabili barvilo benzimidazol (Hoechts 33258) v TNE pufu (10 mM Tris.HCl, 1 mM EDTA, 0,2 M NaCl, pH 7,4) v končni koncentraciji 1 μg/ml. Pred merjenjem koncentracij vzorcev smo fluorometer umerili z DNA telečjega priželjca (100 ng/μl DNA v 1 X TNE pufu).

DNA izoliranih vzorcev smo razredčili na koncentracijo 10 ng/μl in jih do analize shranili v hladilniku pri 4 °C.

3.3.4 Namnoževanje AFLP markerjev v verižni reakciji s polimerazo

Metodo markerjev AFLP smo izvedli po postopku, ki ga predlagajo avtorji tehnike Vos in sod. (1995). Namnoževanje markerjev AFLP je sestavljeno iz restrikcije DNA in ligacije adapterjev, predamplifikacije, selektivne amplifikacije ter elektroforeze.

V fazi restrikcije smo v končnem volumnu 40 μl 250 ng oljčne DNA razrezali s kombinacijami encimov *MseI/PstI* ali *MseI/EcoRI* (New England Biolabs), kjer smo za vsako kombinacijo uporabili 2,5 enote restrikcijskih endonukleaz, v raztopini 1X NEB3 pufra [100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT (Ditiotreitol) (pH 7,9)] in dodatku 1 x BSA (Bovine Serum Albumin – goveji serumski albumin). Restrikcija je potekala 2 uri pri temperaturi 37 °C. Končno inaktivacijo restrikcijskih encimov smo dosegli z inkubacijo reakcijskih mešanic pri temperaturi 70 °C za 15 minut.

Ligacijsko mešanico smo pripravili iz 50 pMol/μl *MseI* adapterja v kombinaciji s 50 pMol/μl *EcoRI* ali 5 pMol/μl *PstI* adapterja, 1 enote T4 DNA ligaze (New England Biolabs), 1X T4 DNA ligaznega pufra [50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 μg/ml BSA (pH 7,5), New England Biolabs] in dodatka vode do končnega volumna 10 μl. Restrikcijski mešanici smo dodali ligacijsko in reakcijske raztopine inkubirali 3 ure v termobloku pri temperaturi 37 °C.

Postopek predamplifikacije smo izvedli z vnaprej razrezano in ligirano DNA (50 ng) z uporabo 50 ng *MseI/PstI* ali *MseI/EcoRI* primerjev z enim selektivnim nukleotidom. Predamplifikacijske reakcijske mešanice smo pripravili v končnem volumnu 50 μl in so vsebovale naslednje reagentne: 2 μl ligacijske mešanice s 50 ng DNA, 1X PCR pufer [10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl (pH 8,3), Roche Molecular Biochemicals], 1,5 enote encima *Taq* polimeraze (Promega), 50 ng *PstI/MseI* ali 50 ng *MseI/EcoRI* primerjev. Predamplifikacija je potekala v cikličnem termostatu GeneAmp 9700 (Applied

Biosystems) pri temperaturi 72 °C za 3 minute ter 20 ciklov ponavljanja naslednjih temperatur:

- 30 sekund pri 94 °C
- 1 minuto pri 56 °C
- 1 minuto pri 72 °C

PCR se je zaključil z ohlajanjem reakcijske mešanice na 12 °C.

Selektivno amplifikacijo smo izvedli na predhodno pripravljenih reakcijskih mešanicah predamplifikacije, s 13-imi različnimi kombinacijami začetnih oligonukleotidov (Bandelj, 2005), ki so vsebovali dva ali tri selektivne nukleotide:

- | | |
|---------------|---------------|
| ▪ P-AAC/M-CAA | ▪ P-AAC/M-CAC |
| ▪ P-AAC/M-CAT | ▪ P-AAC/M-AG |
| ▪ P-ACA/M-CAA | ▪ E-ACT/M-CTC |
| ▪ P-AGA/M-CTT | ▪ E-ACG/M-CTC |
| ▪ P-ACA/M-CAC | ▪ E-ACC/M-CTG |
| ▪ P-AGA/M-CAT | ▪ E-AAC/M-CGA |
| ▪ P-AAC/M-CTC | |

(Opomba: P = *Pst*I, M = *Mse*I, E = *Eco*RI)

Reakcijo za selektivno namnoževanje smo pripravili v končnem volumnu 10 µl in so vsebovale: 2 µl 10X redčene predamplifikacije DNA, 1X PCR pufer [10mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl (pH 8,3), Roche Molecular Biochemicals], 1,5 enote *Taq* polimeraze (Promega), 0,5 mM koncentracijo deoksinukleotida trifosfata (Roche Molecular Biochemicals), ter po 15 ng vsakega začetnih oligonukleotidov v zgoraj navedenih koncentracijah. Vsi začetni oligonukleotidi so bili izdelani pri MWG-Biotech. Selektivna amplifikacija je potekala v napravi GeneAmp 9700 thermal cycler (Applied Biosystems) s sledečim programom:

- 13 ciklov s ponavljanjem:
 - o 94 °C za 30 sekund
 - o 65 °C za 30 sekund, s postopnim zniževanjem temperature za 0,7 °C / cikel
- Sledila je temperatura 72 °C za eno minuto
- In 23 ciklov s temperaturo prileganja 56 °C.

PCR produkti so bili po končani reakciji shranjeni v hladilniku pri 4 °C.

3.3.5 Vrednotenje markerjev AFLP

Analiza produktov je bila opravljena s kapilarno elektroforezo na napravi ABI Prism 3130xl DNA Analyzer.

3.4 MIKROSATELITSKI MARKERJI

3.4.1 Rastlinski material

Za namen odkrivanja mutacij z metodo mikrosatelitskih markerjev, smo uporabili 23 obsevanih in ukoreninjenih oljk sorte 'Canino', ki so rasle v steklenjaku. Z mikrosatelitskimi markerji smo analizirali enak rastlinaki material kot z AFLP markerji.

3.4.2 Izolacija DNA

Za analizo z mikrosatelitskimi markerji smo uporabili enako DNA kot pri analizi z AFLP markerji. Postopek izolacije je opisan v točki 3.3.2.

3.4.3 Merjenje koncentracije DNA

Postopek merjenja koncentracij je bil enak kot pri točki 3.3.3.

3.4.4 Namnoževanje DNA v verižni reakciji s polimerazo

V analizi z mikrosatelitskimi markerji smo uporabili 7 visoko polimorfnih mikrosatelitnih lokusov, ki so bili razviti za oljko in smo jih povzeli po Bandelj in sod. (2002), in so opisani v Preglednica 1.

Preglednica 1: Seznam uporabljenih mikrosatelitskih lokusov

Table 1: Primer sequences used in SSR analysis

Lokus	Nukleotidno zaporedje 5'→3'	Vir
DCA 5	F-TGTAAAACGACGGCCAGTAACAAATCCCATACGAACTGC R-CGTGTTGCTGTGAAGAAAATCG	Sevc in sod. (2000)
DCA3	F-TGTAAAACGACGGCCAGTCCCAAGCGGAGGTGTATATTGTTAC R-TGCTTTTGTCTGTGTTGAGATGTTG	Sevc in sod. (2000)
DCA 9	F-TGTAAAACGACGGCCAGTAATCAAAGTCTTCCTTCTCATTTCG R-GATCCTTCCAAAAGTATAACCTCTC	Sevc in sod. (2000)
DCA11	F-TGTAAAACGACGGCCAGTGATCAAAGTCTGACGAGAGAG R-TTGTCTCAGTGAACCTTAAACC	Sevc in sod. (2000)
DCA14	F-TGTAAAACGACGGCCAGTAATTTTAAATGCACTATAATTTAC R-TTGAGGTCTCTATATCTCCAGGGG	Sevc in sod. (2000)
DCA16	F-TGTAAAACGACGGCCAGTTTAGGTGGGATTCTGTAGATGGTTG R-TTTTAGGTGAGTTCATAGAATTAGC	Sevc in sod. (2000)
GAPU101	F-TGTAAAACGACGGCCAGTCATGAAAGGAGGGGGACATA R-GGCACTTGTGTGCAGATTG	Carriero in sod. (2002)

Reakcijsko mešanico za PCR smo pripravili v skupnem volumnu 15 µl in je vsebovala 25 ng oljčne DNA, 5X PCR pufer (Promega), 0,2 mM vsakega dNTP-ja (Sigma), 2 mM MgCl₂ (Promega), 0,5 enote *Taq* polimeraze (Promega) in tri različne oligonukleotide: 0,2 µM vsakega začetnega in končnega oligonukleotida, 0,25 µM fluorescentno označenega M13 (-21) oligonukleotida (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'), katerega 5' konci so bili označeni s 6-FAM, VIC, NED ali PET fluorescentnim barvilom, kar omogoča, da so PCR produkti vidni in analizirani s kapilarno elektroforezo (Schuelke, 2000) in omogoča multipleks analizo 4-ih različnih lokusov hkrati.

Namnoževanje je potekalo v cikličnem termostatu GeneAmp 9700 (Applied Biosystems) po sledečem temperaturnem profilu:

- Začetna denaturacija pri 95 °C za 1 minuto
- 5 ciklov: 95 °C za 45 sekund
60 °C za 60 sekund, z zmanjševanjem temperature za 1 °C/cikel
70 °C za 90 minut
- 25- 30 ciklov: 95 °C za 45 sekund
55 °C za 60 sekund
72 °C za 90 sekund
- ter končni cikel 8-45 minut pri 65 °C.

Reakcijske produkte smo po končanem namnoževanju združili tako, da je vsaka kolona na plošči vsebovala vse štiri fluorescentne barve, s katerimi smo pred namnoževanjem

označili oligonukleotide. Enemu mikrolitru združenih vzorcev smo dodali še 0,5 μ l dolžinskega standarda GeneScan TM LIZ 600[®] (Applied Biosystems) in 8,5 μ l Hi-Di formamida, ter vzorce analizirali na kapilarni elektroforezi ABI Prism 3130xl DNA analyzer.

3.4.5 Vrednotenje mikrosatelitskih markerjev

Pridobljene rezultate smo analizirali s programom Gene Mapper verzija 4.0 (Applied Biosystems).

3.5 ADVENTIVNA REGENERACIJA OLJKE SORTE 'CANINO'

3.5.1 Izbira primerne tkiva

Za poskus adventivne regeneracije smo preizkusili *in vitro* tkivno kulturo oljke, sorte 'Canino'. Izbrali smo mesec dni stare poganjke v kulturi, izbirali smo take, ki so imeli največje listne peclje. Kot izhodiščni material za indukcijo organogenih struktur smo uporabili listne peclje, listne izsečke in internodije.

3.5.2 Optimizacija gojišč

V prvem poskusu v letu 2008 smo pripravili 12 različnih gojišč. Gojišča smo pripravili iz osnovnega gojišča, v našem primeru gojišče MS (Murashige in Skoog), 20 g/l saharoze, 7 g/l agarja ter pH umerjen na vrednost 5,5. K temu osnovnemu gojišču pa smo dodali rastne hormone različnih skupin in koncentracij. Za poskus adventivne regeneracije smo uporabili petrijevke premera 90 mm in nekaj mililitrov gojišča. Skupno smo za namen adventivne regeneracije preizkusili naslednje različice gojišč:

- 20 μ M TDZ (tidiazuron) in 0,1 mg/l NAA
- 30 μ M TDZ (tidiazuron) in 0,1 mg/l NAA
- 40 μ M TDZ (tidiazuron) in 0,1 mg/l NAA

- 20 μ M TDZ (tidiazuron)
- 30 μ M TDZ (tidiazuron)
- 40 μ M TDZ (tidiazuron)

- 20 μ M meta-topolin in 0,1 mg/l NAA
- 30 μ M meta-topolin in 0,1 mg/l NAA
- 40 μ M meta-topolin in 0,1 mg/l NAA

- 20 µM meta-topolin
- 30 µM meta-topolin
- 40 µM meta-topolin

V začetku leta 2009 smo poskus ponovili, uporabili smo osnovno gojišče s sestavo: MS (Murashige , Skoog) z 20 g/l saharoze, 7g/l agarja ter pH vrednostjo 5,5. kot izhodiščni material smo uporabili samo listne peclje *in vitro* sorte 'Canino'. Dodali smo citokinina BAP in zeatin v različnih kombinacijah. Uporabili smo petrijevke s premerom 90mm in nekaj mililitri gojišča. Za ponoven poskus adventivne regeneracije smo tokrat preizkusili 6 različnih gojišč. Vsa so vsebovala osnovno gojišče, ki je opisano zgoraj, z različnimi koncentracijami citokinina BAP in zeatina:

- | | |
|-------------|----------------|
| ➤ 20 µM BAP | ➤ 20 µM zeatin |
| ➤ 30 µM BAP | ➤ 30 µM zeatin |
| ➤ 40 µM BAP | ➤ 40 µM zeatin |

3.6 TRANSFORMACIJA MIKROSPOR Z DOSTAVNIMI PEPTIDI NA MODELNI RASTLINI

3.6.1 Priprava in uporaba testnih rastlin

Za namen transformacije z dostavnimi peptidi smo uporabili rastline tobaka (*Nicotiana tabacum*). Kot modelno rastlino smo tobak uporabili zaradi časovne neomejenosti uporabe mikrospor, saj so rastline rasle v steklenjaku, kjer smo lahko vplivali na obdobje cvetenja z dodajanjem umetne svetlobe.

Rastline tobaka smo v našem laboratoriju *in vitro* razmnoževali z mikropropagacijo skozi celo leto. Gojišče za razmnoževanje *in vitro* je bilo sestavljeno iz komercialno pripravljene gojišča MS (Murashige , Skoog) (Duchefa) brez dodanih vitaminov, z dodatkom 30 g/l saharoze, vitamini (tiamin 2 mg/l, piridoksin 1 mg/l, nikotinska kislina 1 mg/l) ter agarjem v koncentraciji 8 g/l in pH vrednostjo 5,8.

Ukoreninjene *in vitro* rastline tobaka smo posadili v sadilni substrat v mini plastične rastlinjake za aklimatizacijo, ter jih prenesli v steklenjak Oddelka za agronomijo, kjer so rasle v pogojih z minimalno nočno temperaturo 15 ± 2 °C in maksimalno dnevno temperaturo 25 ± 2 °C s 16 urno fotoperiodo. Po potrebi oziroma za indukcijo cvetenja, smo rastline osvetljevali s pomočjo 600 W natrijevih visokotlačnih svetilk (Hortilux Schreder HPS 600 W/400V).

Ko so rastline priče s tvorbo cvetov, smo izmerili velikost cvetnih brstov, saj smo za namen transformacije potrebovali mikrospore v pozni enojedni fazi. Na podlagi testiranj in meritev cvetnih brstov ter barvanju mikrospor smo ugotovili, da je optimalna velikost cvetnih brstov 1,5 cm in je v takih cvetnih brstih največ mikrospor v pozni enojedni fazi. Cvetne brste smo torej izmerili in odrezali iz rastline ter jih odnesli v laboratorij, kjer smo nadaljevali z izolacijo mikrospor.

3.6.2 Postopek transformacije

Izolacija mikrospor tobaka je potekala v komori za aseptično delo in sicer po protokolu Touraev in sod. (1999). Zaprte cvetne brste smo sterilizirali v dikoroizocianurni kislini natrijeve soli (DICA) s koncentracijo 0,83 g/50 ml za 20 minut. Po končani sterilizaciji smo s sterilnim plastičnim batom iztisnili antere iz cvetnih brstov v petrijevko s 3 ml gojišča B [20 mM KCl, 1 mM CaCl₂ X 2H₂O, 1 mM MgSO₄ X 7H₂O, 300 mM manitol, 1 mM fosfatni pufer; pH 7,0]. Za eno ponovitev transformacije smo uporabili 20 – 30 cvetnih brstov. Ko smo iztisnili antere, smo zamenjali gojišče s 6 mililitri svežega gojišča B, ter antere predstavili v sterilno čašo z magnetnim mešalom, kjer smo nato antere mešali na visokih obratih 2 do 3 minute. Suspenzijo anter in mikrospor smo nato precedili skozi 60 mikronsko kovinsko cedilo, suspenzijo prelili v centrifugirko in centrifugirali na hitrosti 200g za 3 minute. Po končanem centrifugiranju smo iz centrifugirke odlili supernatant ter s pipeto odstranili zgornji, zeleni del dvobarvnega peleta, ki je predstavljal stene anter. Spodnji pelet bele barve smo nato resuspendirali z 2-10 ml gojišča B, odvisno od željene koncentracije. Mikrospore, razredčene na koncentracijo 700 000 celic/ml smo do uporabe hranili na sobni temperaturi in so bile uporabljene najkasneje 1 uro po izolaciji.

Protokol za transformacijo mikrospor z dostavnimi peptidi je bil razvit v sodelovanju z raziskovalnim centrom za kmetijstvo v mestu Lethbridge v Kanadi. Potek protokola bi lahko razdelili na tri dele in sicer : 1. Izolacijo mikrospor, 2. Priprava dostavnih peptidov in tarčne DNA molekule ter 3. Detekcija transformiranih mikrospor.

Za transformacijo z GUS genom, smo izbrali GUS plazmid SF-16 s promotorjem Dc3, ki je v splošnem poznan kot najučinkovitejši plazmid za tovrstno transformacijo (Touraev in sod., 1995).

Po končani izolaciji mikrospor smo se lotili priprave raztopine z dostavnimi peptidi. Za poskus transformacije z dostavnimi peptidi smo izbrali peptid Tat₂ (Sigma). V prvi Eppendorf tubici smo pripravili raztopino s 4μg peptida Tat₂ in 100 μl sterilne vode. V drugi Eppendorf tubici pa smo pripravili raztopino z 1 μg GUS gena in 100 μl sterilne vode. Zatam smo raztopine obeh epic združili ter inkubirali 15 minut na sobni temperaturi, z občasnim rahlim mešanjem. Po pretečenem času inkubacije smo dodali še 5 μg Lipofectamina (Invitrogen) ter inkubirali še nadaljnih 5 minut. K raztopini Tat₂ peptida in GUS gena

smo nato dodali 200 µl predhodno pripravljenih mikrospor ter začeli z inkubacijo na sobni temperaturi za 15 minut.

Po končani inkubaciji smo v Eppendorf tubico dodali še 100 µl svežega gojišča B, ter centrifugirali suspenzijo na 100g za 5 minut. Nato smo odstranili 300 µl supernatanta in preostalo suspenzijo iz Eppendorf tubic prestavili na majhne petrijevke premera 20 mm, ter v temi inkubirali čez noč.

3.6.3 Detekcija transformiranih celic

Naslednji dan smo za namen detekcije transformiranih mikrospor tobaka opravili barvanje za ekspresijo GUS gena. Pripravili smo raztopino z 1 mM x-Gluc, 500 mM NaPO₄, 10 mM x-Gluc, 20 % metanola in vode do končnega volumna 20 ml. Raztopino za barvanje smo dodali k inkubiranim mikrosporom v zelo majhni količini (500 µl), ter pričeli analizo transformacije na svetlobnem mikroskopu Nikon Eclipse 80i (Japan).

4 REZULTATI

4.1 OPTIMIZACIJA PROTOKOLA ZA VZPOSTAVITEV *in vitro* KULTURE 'ISTR-SKE BELICE'

Za vzpostavitev tkivne kulture sorte 'Istrska belica' smo od leta 2008 naprej preizkušali različne variacije gojišč z različnimi dodatki in rastnimi hormoni. Zadnji protokol poskusa, ki je opisan v točki 3.1.2, se je izkazal za uspešnega, vendar pa smo pred tem za optimizacijo uspelega protokola opravili kar nekaj poskusov za pridobitev optimalnega in delujočega protokola. V Preglednici 2 so navedeni vsi poskusi, ki smo jih opravili od leta 2008 do leta 2013.

Pri poskusu številka 4 (Preglednica 2) smo prvič dosegli rast poganjkov iz nodijskih izsečkov, vendar so kmalu po nastavitvi v novo, identično gojišče propadli. Velik problem skozi celotno optimizacijo protokola predstavljala tudi hitra porjavlost tkiv v kulturi in nadaljni propad nodijskih izsečkov. Večji napredek je bil opazen po dodajanju ravnega hormona zeatin ribozida v višjih koncentracijah, in pa namakanje izsečkov v raztopini askorbinske kisline, kot je to opisano pri poskusu št. 10. Poskus je uspel do stopnje, kjer so bili novo nastali poganjki dolgi centimeter in pol, vendar so ob prestavitvi v novo gojišče propadli (Slika 4).



Slika 4: Primer uspešne faze iniciacije iz poskusa št. 10

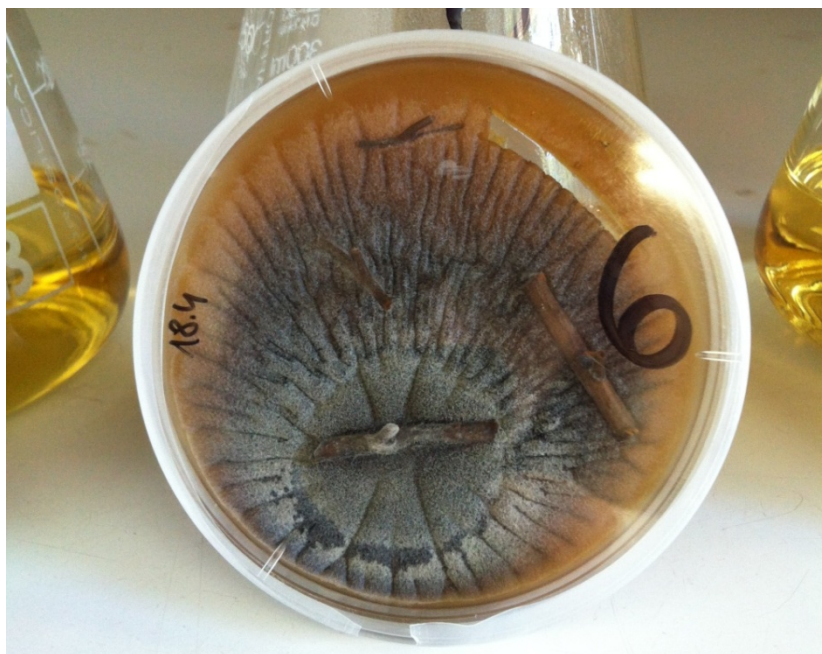
Figure 4: First initiation of cv 'Istrska belica' achieved by protocol number 10

Preglednica 2: Pregled vseh poskusov pred uspešno vzpostavitev *in vitro* tkivne kulture 'Istrske belice'
Table 2: List of experiments before first generation of *in vitro* culture cv 'Istrska belica'

Številka poskusa	Postopek razkuževanja	Čas razkuževanja	Gojišče	Dodatki v gojišču	Dodani rastni hormoni
1	Etanol 70% - 1 minuta; nato smo uporabili ločeno dve koncentraciji razkužila DICA: 0,83g in 1,66 g/50 ml vode + Tween 20	10 minut	DKW gojišče + 30 g/l saharoze + 8g/l agar, pH 5,8	vitamini: 2mg/l tiamina, 1 mg/l piridoksina	0,1 mg/l GA3; 1 mg/l GA3; 10 mg/l GA3
2	DICA: 0,83 g/50 ml vode + Tween 20 in druga varianta samo z etanolom (70%)	15 minut	DKW gojišče + 30g/l saharoze + 8g/l agar, pH 5,8		
3	DICA: 0,83 g/50 ml vode + Tween 20	10 minut	DKW gojišče + 30 g/l saharoze + 8 g/l agar, pH 5,8		
4	DICA, 0,83 g/50 ml vode + Tween 20	10 minut	DKW gojišče + 30 g/l saharoze + 8 g/l agar, pH 5,8	vitamini: 2 mg/l tiamina, 1 mg/l piridoksina	zeatin in BAP v različnih koncentracijah (0,5; 1; in 2 mg/l) z dodatkom IAA (0,1 mg/l)
5	spiranje pod tekočo vodo 30 minut + DICA (2,7 g/150 ml vode) + Tween 20	20 minut	DKW gojišče + 30 g/l saharoze + 8 g/l agar, pH 5,8		zeatin in BAP v različnih koncentracijah (0,5; 1; in 2 mg/l) z dodatkom IAA (0,1 mg/l)
6	DICA: 0,415 g/50 ml vode in pa drugi poskus s 0,83 g/50 ml vode + Tween 20	15 minut	OM gojišče + 36 g/l manitola + 7 g/l agarja; pH 5,8		zeatin in BAP v različnih koncentracijah (0,5; 1; in 2 mg/l) z dodatkom IAA (0,1 mg/l)
7	DICA, 0,83 g/50 ml vode + Tween 20	15 minut	OM gojišče + 36 g/l manitola + 7 g/l a garja; pH 5,8		zeatin in BAP v različnih koncentracijah (0,5; 1; in 2 mg/l) z dodatkom IAA (0,1 mg/l)
8	DICA, 0,83 g/50 ml vode + Tween 20	10 minut	OM gojišče + 36 g/l manitola + 7 g/l a garja; pH 5,8		zeatin 2 mg/l in GA3 1 mg/l
9	DICA, 0,83 g/50 ml vode + Tween 20	10 minut	OM gojišče + 36g/l manitola + 7g/l agarja; pH 5,8		zeatin 2 mg/l in GA3 1 mg/l
10	spiranje pod tekočo vodo 1 uro, namakanje v sterilni vodi z dodatkom askorbinske kisline (20 mg/l) + DICA 0,83g /50ml vode + Tween 20	10 minut	OM gojišče + 36 g/l manitola + 7 g/l agarja; pH 5,8, druga varianta identična samo namesto manitola je saharoza		zeatin 4 mg/l
11	spiranje pod tekočo vodo 1 uro, namakanje v sterilni vodi z dodatkom askorbinske kisline (20 mg/l) + DICA 0,83g/50ml vode + Tween 20	10 minut	OM gojišče + 36 g/l manitola + 7 g/l agarja; pH 5,8, druga varianta identična samo namesto manitola je bila dodana saharoza	antibiotiki: CEFOTAXIM (200 mg/l) in VANCOMYCIN (100 mg/l)	zeatin 4 mg/l
12	spiranje pod tekočo vodo 1 uro, namakanje v sterilni vodi z dodatkom askorbinske kisline (20 mg/l) + DICA 0,83 g/50ml vode + Tween 20	20 minut	OM gojišče + 30 g/l manitola + 7 g/l agarja; pH 5,8		zeatin 2 mg/l + GA3 40 mg/l
13	DICA 60 mg/50ml + Tween 20	15 minut	OM gojišče + 30 g/l manitola + 7 g/l agarja; pH 5,8	antibiotiki: CEFOTAXIM (200 mg/l) in VANCOMYCIN (100 mg/l)	zeatin 4 mg/l + GA3 40 mg/l
14	spiranje pod tekočo vodo 1 uro, namakanje nodijev v raztopini askorbinske in citronske kisline (20 : 200 mg/l) - 1 uro, sterilizacija nodijev v raztopini 70 % etanol- 1 minuta (mešanje), sledi standardna sterilizacija z DICA, 0,83 g/50ml vode + Tween 20	15 minut	DKW gojišče + 30 g/l manitola + 7 g/l agar, pH 6,0 in gojišče OM + 30 g/l manitola + 7 g/l agar, pH 6,0	nano-silver (4 mg/l)	zeatin 4 mg/l ali 2iP 4 mg/l

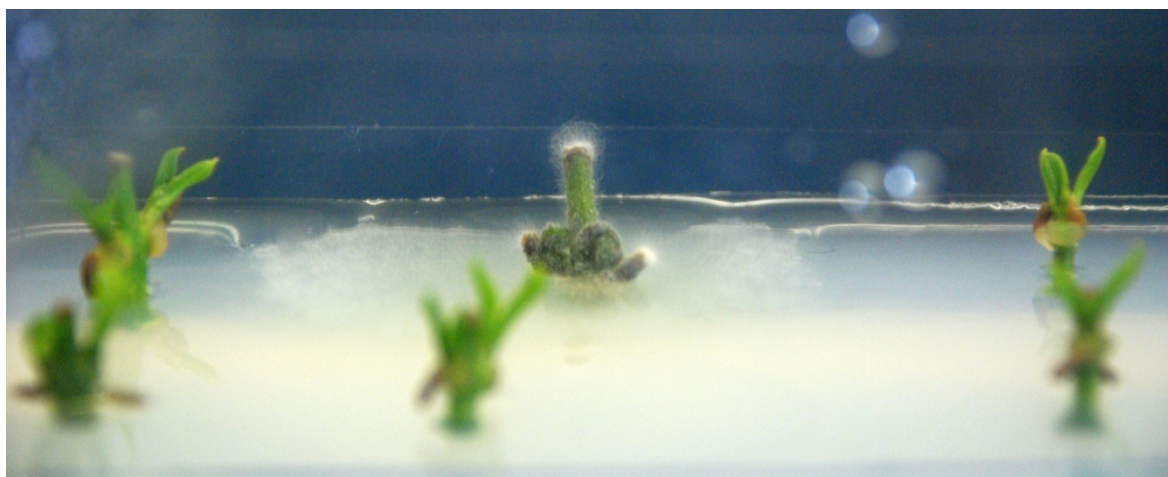
Skozi prvo, iniciacijsko fazo so velik problem predstavljale tudi zelo pogoste okužbe nodijskih izsečkov, ki so se pojavile takoj na začetku in so izsečki odmrli takoj po nastavitvi v gojišče, ali pa so se pričele pojavljati šele mesec dni kasneje in so prav tako vodile v propad izsečkov.

Z namenom preverjanja endogenih okužb, s postopkom, ki je opisan v točki 3.1.5, smo zaradi neprestanega pojava okužb (Slika 6), želeli preveriti, ali gre za endofitske glive, ki bi lahko povzročale težave pri vzpostavitvi tkivne kulture. *In vitro* izsečke smo po enem mesecu v aseptičnih pogojih vzdolžno prerezali in predstavili na gojišče za gojenje gliv. Na Sliki 5 je prikazan primer razraščene glive iz razkuženega nodijskega izsečka, po enem mesecu na omenjenem gjišču. Z analizo rezultatov, ki smo jih pridobili z uporabo ITS markerjev in sekvenčne reakcije, smo ugotovili, da gre v šestih primerih od desetih analiziranih, nepoznanih vrst, dejansko za prisotnost endofitskih gliv, ki se pojavljajo tudi pri drugih drevesnih vrstah. Identificirali smo šest različnih vrst gliv: *Chaetomium globosum*, *Biscogniauxia nummularia*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Cladosporium* sp. MS-2011-F14, *Preussia* sp. 1 ICMP 18937 in *Sistotrema brinkmannii* strain ATTC 26295. Omenjene glive smo identificirali na podlagi pridobljenih nukleotidnih zaporedij z uporabo BLAST orodja (ang. Basic Local Alignment Search Tool). Pridobljeni in podrobni rezultati, z najmanj 99 % ujemanjem, so za vsako glivo posebej predstavljeni v Prilogi



Slika 5: Izraščanje glive iz nodijskega izsečka po enem mesecu

Figure 5: Endophytic fungi from nodal segments after one months



Slika 6: Okužen nodijski izseček v *in vitro* kulturi sorte 'Istrska belica'

Figure 6: Nodal *in vitro* contamination of variety 'Istrska belica'

Ker so se tekom celotne dobe preizkušanja različnih gojišč pojavljale okužbe z glivami (Slika 6), smo se odločili za uporabo nano delcev srebra (Nano Silver) (Sigma), ki smo jih dodali pred avtoklaviranjem (4 mg/l), in naj bi uspešno upočasnili rast gliv in bakterij v gojišču. Nano Silver smo pričeli uporabljati v fazi, ko smo že pridobili prve poganjke, po uspešnem protokolu pod številko 14 in so bili pripravljeni na nadaljne razmnoževanje. Izkazalo se je da nanodelci srebra učinkovito zavirajo rast gliv. To metodo smo kasneje pričeli uporabljati v vseh stopnjah razvoja tkivne kulture.

Za uspešen način razkuževanja se je izkazal protokol, opisan pri poskusu 14, ko smo nodijske izsečke spirali pod tekočo vodo ter jih nato namakali v razropini 70 % etanola.

Pri poskusih številka 11 in 13 (Preglednica 2) smo pričeli z uporabo antibiotikov (cefotaksim in vankomicin), ki smo jih sterilno dodajali v gojišča po avtoklaviranju, zaradi pojava bakterijskih okužb. Izkazalo se je da izbrani antibiotiki niso bili učinkoviti, saj so se bakterijske okužbe ponovile.

Vzpostavitev *in vitro* kulture je uspela v letu 2013, po postopku opisanem v točki 3.1. Za zelo uspešno se je izkazalo namakanje nodijskih izsečkov v mešanici askorbinske in citronske kisline, v koncentraciji 20:200 mg/l za 1 uro. S tem smo uspešno premostili velik problem porjavelosti tkiv in propad nodijskih izsečkov v prvem tednu poskusa vzpostavitve tkivne kulture. Za iniciacijo tkivne kulture se je najbolje izkazalo gojišče DKW s 30 g/l manitola, 7 g/l agarja, in dodatkom 4 mg/l zeatin ribozida ter pH vrednostjo 6,0, kjer smo pridobili največ novih poganjkov. Poganjki so bili v primerjavi z ostalimi, na drugih preizkušanih gojiščih, tudi daljši. Ob subkultivaciji po mesecu dni so bili vsi poganjki iz vseh testiranih gojišč, opisanih v točki 3.1.2 prestavljeni na gojišče DKW s 4 mg/l zeatin ribozida.

V fazi izdolževanja poganjkov se je gojišče OM s 33 g/l manitola, 7 g/l agarja in dodatkom 4,8 mg/l zeatin ribozida, 1,49 mg/l giberelinske kisline in pH vrednostjo 6,0, izkazalo za najbolj optimalno. Rast poganjkov je bila nekoliko hitrejša kot pri ostalih gojiščih, drugih bistvenih razlik med gojiščema OM in DKW z identičnimi dodatki rastnih hormonov v fazi izdolževanja poganjkov pa nismo zaznali. Inicijacija tkivne kulture je prikazana na Sliki 7, kjer so vidni propadli in porjaveli nodijski izsečki in pa preživeli nodijski izsečki z novimi poganjki, ki smo jih kasneje prestavili na gojišče za izdolževanje poganjkov, kot je opisano v točki 3.1.3.



Slika 7: Faza iniciacije *in vitro* kulture oljke sorta 'Istrska belica'

Figure 7: Initiation of *in vitro* culture of variety 'Istrska belica'

Na Sliki 8 je prikazana faza izdolževanja poganjkov, kjer smo novo izrasle poganjke iz faze iniciacije razrezali na enonodijske segmente in jih prestavili na gojišče za izdolževanje poganjkov, ki se je izkazalo za najboljše, torej gojišče OM z dodatkom 4,8 mg/l zeatin ribozida in 1,49 mg/l giberelinske kisline.



Slika 8: Faza izdolževanja poganjkov sorte 'Istrska belica' *in vitro*

Figure 8: Shoot proliferation of variety 'Istrska belica' *in vitro*

Za razmnoževanje oziroma mikropropagacijo *in vitro* kulture oljke smo izbrali gojišče OM s 36 g/l manitola, 7 g/l agarja, 2 mg/l zeatin ribozida, 1 mg/l giberelinske kisline ter s pH vrednostjo 5,8. Gojišče je podobno kot ga uporabljamo za mikropropagacijo sorte Canino in se je izkazalo kot zelo dobro tudi v primeru razmnoževanja 'Istrske belice' (Slika 9).



Slika 9: Uspešna rast poganjkov oljk sorte 'Istrska belica'

Figure 9: Shoot elongation of olive variety 'Istrska belica'

4.2 OBDELAVA REZULTATOV MORFOLOŠKIH MERITEV NA OBSEVANIH RASTLINAH

Za obsevanje *in vitro* kulture smo izbrali oljko sorte 'Canino', ki smo jo v našem laboratoriju razmnoževali z mikropropagacijo od leta 2008. Na začetku poskusa smo pričeli z obsežno mikropropagacijo, da bi pridobili dovolj rastlinskega materiala namenjenega obsevanju.

Za obsevanje smo uporabili cele poganjke *in vitro* kulture, le-te pa smo po obsevanju razrezali na enonodijske segmente. Vzporedno smo izvedli dva poskusa, in sicer: obsevanje z vstavkom aluminijaste folije pod izvorom sevanja, ki naj bi pospešila gibanje elektronov, in pa obsevanje brez vstavka aluminijaste folije. Pred pričetkom obsevanja smo rastlinski material razdelili na približno dva enaka dela. Po obsevanju smo tako pridobili 461 nodijskih izsečkov, ki so bili obsevani z vstavkom aluminijaste folije in 556 nodijskih izsečkov ki je bilo obsevanih brez vstavka aluminijaste folije. Poganjke iz tkivne kulture smo na petrijevkah v sterilnih pogojih obsevali z različnimi dozami sevanja, kot je opisano v točki 3.2.2. Po končanem obsevanju smo enonodijske izsečke predstavili v naprej pripravljeno gojišče. Morfološke meritve obsevanih tkiv smo izvedli mesec dni po obsevanju. Parametre koreninjenja smo dopolnili, preden smo rastline predstavili v zemljo in začeli z aklimatizacijo. V Preglednici 3 so opisane morfološke meritve 461-tih nodijskih izsečkov, obsevanih z uporabo aluminijaste folije, v Preglednici 4 pa morfološke meritve 556-ih nodijskih izsečkov brez aluminijaste folije.

Kot je razvidno iz Preglednice 3 je povečevanje doze obsevanja vplivalo na vse merjene parametre. Najvišja doza sevanja (60 Gy) z uporabo filtra aluminijaste folije je vplivala na izgubo teže poganjkov za 36 % , sevanje z enako dozo brez uporabe filtra aluminijaste folije pa je povzročilo popoln propad poganjkov. Podobno je tudi z višino poganjkov, kjer se ob povečevanju doze sevanja višina poganjkov manjša. Vpliv sevanja smo zaznali tudi pri koreninjenju poganjkov, kjer smo opazili, da doza sevanja 10 Gy rahlo povečuje zmožnost koreninjenja v obeh primerih, medtem ko obsevanje s 30 Gy zavira zmožnost koreninjenja poganjkov. Pri najvišji dozi obsevanja z vstavkom aluminijaste folije so bili poganjki močno poškodovani, pri obsevanju brez aluminijaste folije pa je bila rast popolnoma inhibirana.

Preglednica 3: Morfološke meritve obsevanih nodijskih izsečkov po 30 dneh v tkivni kulturi, s filtrom aluminijaste folije

Table 3: Morphological measurements of irradiated plantlets after 30 days in tissue culture, with aluminium foil filter shielding

	0 Gy	10 Gy	30 Gy	60 Gy
Povprečna teža poganj- kov (g)	0,384 ± 0,15 ^a	0,422 ± 0,16 ^b	0,357 ± 0,13 ^a	0,246 ± 0,11 ^c
Povprečna višina poga- njkov (mm)	54,61 ± 18,32 ^a	56,32 ± 16,10 ^a	60,44 ± 15,4 ^b	36,53 ± 9,95 ^c
Število obsevanih nodijskih izsečkov	78	127	125	131
Odstotek ukoreninjenih poganjkov (%)	74,36	66,93	51, 2	29,01

^{a, b, c} morfološki parametri, označeni z enakimi črkami se po vrednosti statistično značilno ne razlikujejo po Duncanovem testu ($P < 0.05$).

Preglednica 4: Morfološke meritve obsevanih nodijskih izsečkov po 30 dneh v tkivni kulturi, brez filtra aluminijaste folije

Table 4: Morphological measurements of irradiated plantlets after 30 days in tissue culture, without aluminium foil filter shielding

	0 Gy	10 Gy	30 Gy	60 Gy
Povprečna teža poganj- kov (g)	0,343 ± 0,14 ^a	0,423 ± 0,21 ^b	0,293 ± 0,11 ^c	0
Povprečna višina poga- njkov (mm)	56,45 ± 18,09 ^a	59,51 ± 17,15 ^b	40,23 ± 17,37 ^c	0
Število obsevanih nodijskih izsečkov	102	198	124	132
Odstotek ukoreninjenih poganjkov (%)	59, 80	64,14	34,67	0

^{a, b, c} morfološki parametri, označeni z enakimi črkami se po vrednosti statistično značilno ne razlikujejo po Duncanovem testu ($P < 0.05$).

Koreninjenje obsevanih oljk je potekalo *in vitro* s preizkušanjem različnih gojišč. Kot najbolj optimalno gojišče se je izkazalo gojišče ¼ MS s 25 g/l saharoze, 50 mg/l mioinozitola, 1 mg/l IBA in pH vrednostjo umerjeno na 5,8. Po uspešnem koreninjenju so bile oljke predstavljene v steklenjak Oddelka za agronomijo, kjer so po dobi aklimatizacije pričele z rastjo (Slika 10).



Slika 10: Obsevane in ukoreninjene oljke sorte 'Canino' v steklenjaku Oddelka za agronomijo

Figure 10: Irradiated and rooted olives of cultivar 'Canino' in greenhouse

4.3 REZULTATI MERJENJA VELIKOSTI GENOMA S PRETOČNO CITOMETRIJO

Velikost jedrnega genoma rastlin, 6 mesecev po obsevanju, smo izmerili na pretočnem citometru Partec CyFlow Space, ki za analizo uporablja linearno skalo. Za merjenje velikosti genoma smo izbrali mlade liste 19-ih obsevanih rastlin, za standard pa smo izbrali liste graha (*Pisum sativum* cv. Kleine Rheinländerin). Izmerjenih je bilo 7500 jeder na vzorec, z najmanj tremi ponovitvami za vsako rastlino posebej. Izmerjene vrednosti velikosti jedrnega genoma vseh 19-ih rastlin, so opisane v Preglednici 5. Za določitev pozicije G0/G1 vrha je bil uporabljen Flomax software (Partec Münster). Statistično analizo pa smo opravili s programom Statgraphics Plus za Windows 4.0.

Preglednica 5: Določitev velikosti jedrnega genoma s pretočno citometrijo
Table 5: Determination of nuclear DNA content by flow cytometry

Prejeta doza sevanja/genotip	Velikost jedrnega genoma (pg)	Povprečna vrednost jedrnega genoma $\pm$ SD
Kontrola/ 3	3,019	$2,972 \pm 0,044$ ab ¹
Kontrola /9	2,935	
Kontrola /21	2,954	
10 Gy /1	3,006	$2,963 \pm 0,043$ a
10 Gy /2	2,992	
10 Gy /7	2,948	
10 Gy /8	2,930	
10 Gy /10	3,036	
10 Gy /12	2,954	
10 Gy /17	2,938	
10 Gy /18	2,935	
30 Gy /4	2,946	$2,936 \pm 0,021$ b
30 Gy /6	2,933	
30 Gy /9	2,951	
30 Gy /11	2,948	
30 Gy /13	2,923	
30 Gy /14	2,919	
30 Gy /15	2,923	
30 Gy /23	2,944	

¹odstotki označeni z enakimi črkami se po vrednosti statistično značilno ne razlikujejo po Duncanovem testu ($P < 0.05$).

Pri velikostih izmerjenega jedrnega genoma vseh analiziranih oljk je prišlo do nekaterih razlik (Preglednica 5). Izmerjena velikost jedrnega genoma pri neobsevanih, kontrolnih rastlinah znaša 2,972 pg/2C, pri rastlinah s prejeto dozo sevanja 10 Gy znaša velikost jedrnega genoma 2,963 pg/2C in pri rastlinah s prejeto sevalno dozo 30 Gy, 2,935 pg/2C. Iz rezultatov je razvidno, da se velikost jedrnega genoma zmanjšuje s povečevanjem doze sevanja. Velikost jedrnega genoma je pri rastlinah, obsevanih z dozo 30 Gy statistično značilno manjša v primerjavi z velikostjo jedrnega genoma rastlin obsevanih s sevalno dozo

10 Gy. Poganjki, obsevani s količino sevanja 60-ih Gy v analizo niso bili vključeni, ker se niso ukoreninili, ali pa niso preživeli aklimatizacije.

4.4 ANALIZA AFLP

Analiza produktov je bila opravljena s kapilarno elektroforezo na napravi ABI Prism 3130xl DNA Analyzer. Pridobljene rezultate smo analizirali s programom Gene Mapper verzija 4.0 (Applied Biosystems).

4.4.1 Rezultati in analiza AFLP markerjev

Uspešnost restrikcije z restrikcijskimi endonukleazami *Pst*I, *Mse*I in *Eco*RI in ligacije smo preverili na 1,4 % agaroznem gelu in po pozitivnih rezultatih nadaljevali s postopkom predamplifikacije opisane v točki 3.3.4.

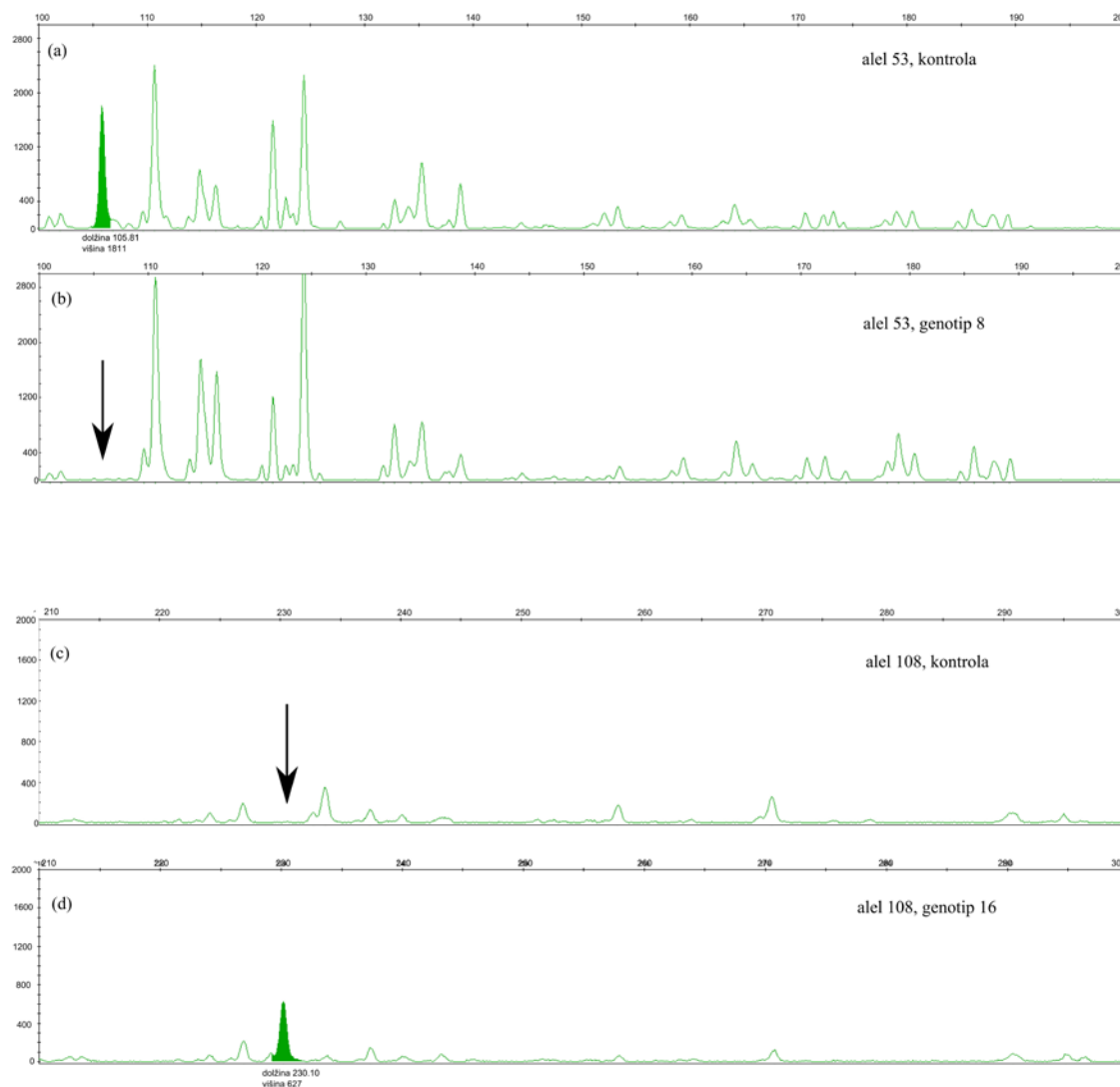
V analizi DNA z AFLP markerji smo uporabili 13 kombinacij začetnih oligonukleotidov, ki so pri vseh 23-ih obsevanih oljkah sorte 'Canino' namnožile različno število fragmentov. Število namnoženih fragmentov je variiralo od 3 do 159 in je bilo odvisno od kombinacije začetnih oligonukleotidov. Skupno je bilo namnoženih 630 fragmentov, od katerih je bilo 179 polimorfnih (28,4 %). Podrobni rezultati polimorfizma, števila namnoženih fragmentov glede na kombinacijo AFLP začetnih oligonukleotidov so predstavljeni v Preglednici 6.

Preglednica 6: Skupno število namnoženih fragmentov, odstotek polimorfizma in število polimorfnih fragmentov, namnoženih s 13-imi kombinacijami AFLP začetnih oligonukleotidov

Table 6: Primer combinations with polymorphism (%) and total numbers of bands obtained through the AFLP technique

Kombinacija začetnih oligonukleotidov	Število vseh namnoženih fragmentov	Število polimorfnih fragmentov	Odstotek polimorfnih fragmentov (%)
<i>Eco-aac/Mse-cga</i>	24	22	91,7
<i>Eco-act/Mse-ctc</i>	16	7	43,8
<i>Eco-acg/Mse-ctc</i>	23	14	60,9
<i>Eco-acc/Mse-ctg</i>	74	15	20,3
<i>Pst-aga/Mse-cat</i>	97	12	12,4
<i>Pst-aca/Mse-cac</i>	159	32	20,1
<i>Pst-aac/Mse-ctc</i>	14	10	71,4
<i>Pst-aac/Mse-cac</i>	16	1	6,3
<i>Pst-aac/Mse-caa</i>	42	22	52,4
<i>Pst-aac/Mse-cat</i>	3	1	33,3
<i>Pst-aca/Mse-caa</i>	10	3	30,0
<i>Pst-aga/Mse-ctt</i>	22	18	81,8
<i>Pst-aac/Mse-ag</i>	130	22	16,9

Polimorfizem se je izrazil kot pojav ali odsotnost določenega fragmenta glede na kontrolni, neobsevani genotip. Na Sliki 10 je prikazan primer odsotnosti fragmenta (b) glede na kontrolo (a) in pojav novega fragmenta (d) glede na kontrolo (c).

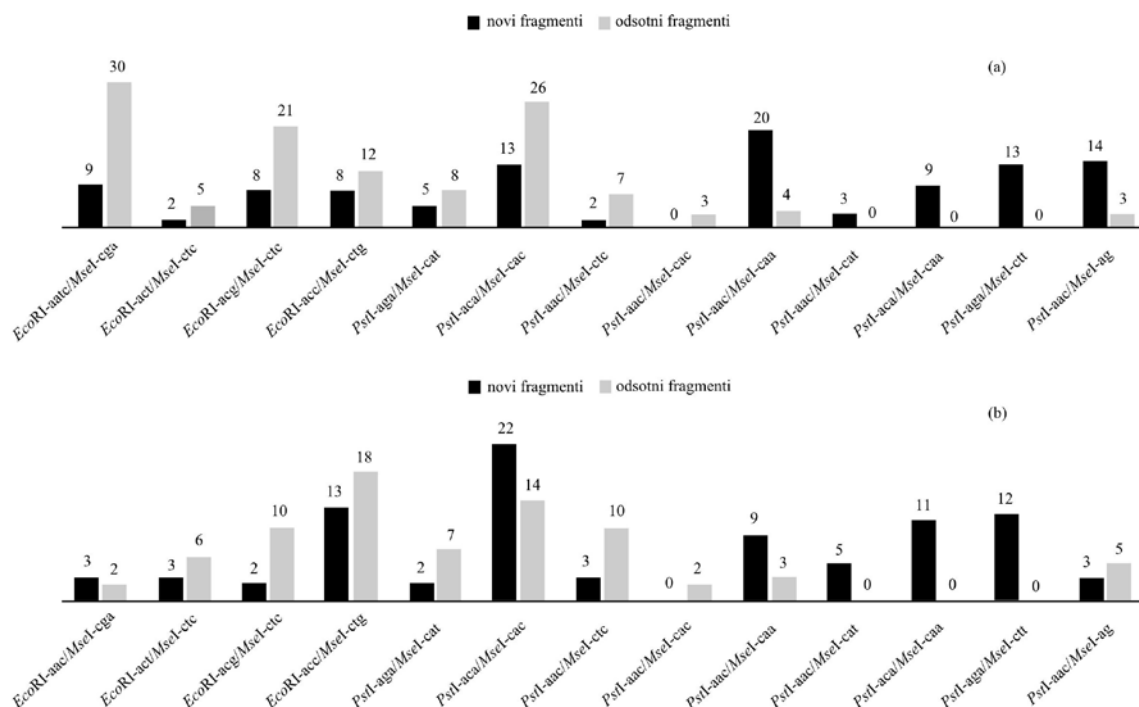


Slika 11: AFLP elektroferogram *Pst*-aac/*Mse*-ag kombinacije začetnih oligonukleotidov; puščice prikazujejo (a),(b) odsotnost fragmenta, prisotnega v kontrolni rastlini in (c),(d) pojav novega fragmenta glede na kontrolno rastlino, pri sevalni dozi 10 Gy

Figure 11: AFLP electropherogram of primer combination *Pst*-aac/*Mse*-ag; arrows indicate (a),(b) absence of peak present in control plants (c),(d) formation of an additional fragment at 10 Gy

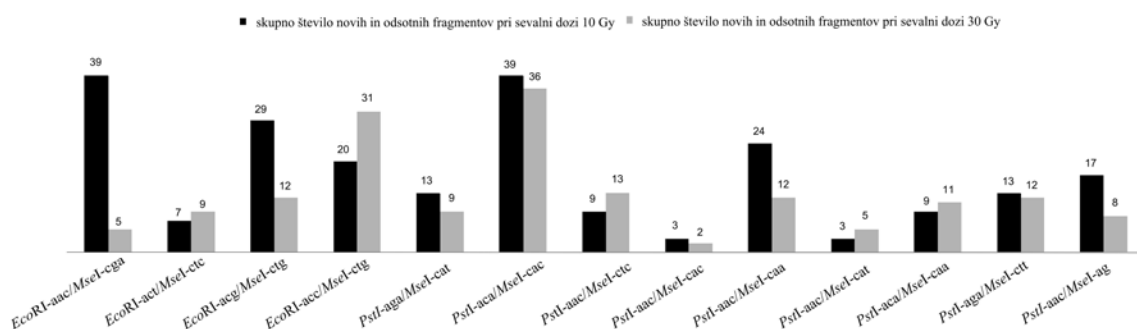
Odstotek polimorfizma znaša od 6,3 % do 91,7 % glede na kombinacijo začetnih oligonukleotidov. Kombinacije začetnih oligonukleotidov *Pst*-aca/*Mse*-cac in *Pst*-aac/*Mse*-ag so namnožile veliko število fragmentov, vendar pa je bilo polimorfnihih zelo malo, medtem ko so kombinacije začetnih oligonukleotidov *Eco*-aac/*Mse*-cga in *Pst*-aga/*Mse*-ctt namnožile majhno število visoko polimorfnihih fragmentov.

Povezava med pojavom ali odsotnostjo fragmentov glede na kombinacijo začetnih oligonukleotidov in različno (10 Gy, 30 Gy) dozo obsevanja, je predstavljena na Sliki 11.



Slika 12: Skupno število novih ali odsotnih fragmentov za vsako kombinacijo začetnih oligonukleotidov posebej, pri sevalni dozi 10 Gy (a) in 30 Gy (b)

Figure 12: Total number of new and absent bands of each primer combination (a) at a 10 Gy dose of radiation and (b) at a 30 Gy dose of radiation



Slika 13: Skupno število novih in odsotnih fragmentov glede na kombinacijo začetnih oligonukleotidov za sevalno dozo 10 Gy in 30 Gy

Figure 13: Total number of new and absent bands of each primer combination at 10 and 30 Gy dose of radiation

Pri rastlinah, ki so prejele sevalno dozo 10 Gy smo zaznali večjo odsotnost fragmentov, glede na kontrolne rastline, pri rastlinah s prejeto sevalno dozo 30 Gy pa smo ugotovili večje število novih fragmentov v primerjavi s kontrolnimi rastlinami. *Eco-aac/Mse-cga*,

Pst-aca/Mse-cac in *Eco-acg/Mse-ctc* kombinacije začetnih oligonukleotidov so pri dozi 10 Gy pokazale največje število odsotnih fragmentov, medtem ko smo pri sevalni dozi 30 Gy s kombinacijami začetnih oligonukleotidov *Pst-aca/Mse-cac*, *Eco-acc/Mse-ctg* in *Pst-aga/Mse-ctt* zabeležili najvišje število novih fragmentov, v primerjavi s kontrolnimi rastlinami (Slika 12). Takšni novi fragmenti so bili denimo zaznani pri kombinacijah P-aac-M-cat-alel 158, kjer je bilo novih fragmentov 13 (72,2 %) in P-aca-M-caa-alel 104, kjer je bilo zaznanih 8 (44,4 %) novih fragmentov od vseh 23ih analiziranih vzorcev. Na Sliki 13 je prikazano skupno število novih in odsotnih fragmentov glede na kombinacijo začetnih oligonukleotidov. Iz slike je razvidno, da je skupno število novonastalih in odsotnih fragmentov večje pri sevalni dozi 10 Gy.

4.5 ANALIZA MIKROSATELITSKIH MARKERJEV

Analiza produktov mikrosatelitskih markerjev je bila opravljena s kapilarno elektroforezo na napravi ABI Prism 3130xl DNA Analyzer. Pridobljene rezultate smo analizirali s programom Gene Mapper verzija 4.0 (Applied Biosystems).

4.5.1 Rezultati in analiza mikrosatelitskih markerjev

Za analizo DNA obsevanih rastlin z mikrosatelitskimi markerji smo uporabili 7 mikrosatelitskih lokusov, ki so opisani v Preglednici 1. Po pregledu in analizi rezultatov smo ugotovili, da se mikrosatelitski lokus z oznako DCA3 ni pomnožil, oziroma rezultati niso bili popolni, zato smo se odločili da ga izločimo iz končne analize. Tako smo analizo opravili na podlagi 6-ih mikrosatelitskih lokusov. Mikrosatelitski profili vseh analiziranih vzorcev, tako tretiranih z obsevanjem (10 Gy, 30 Gy), kot netretiranih, pa so prikazani v Preglednici 7.

Preglednica 7: Dolžine alelov šestih mikrosatelitskih lokusov testiranih na obsevanih (10 Gy, 30 Gy) in kontrolnih rastlinah oljke, sorte 'Canino'

Table 7: Allele sizes of the 6 microsatellite loci amplified in tested control and putative mutant samples of *O. europaea* cv. Canino

Genotip	Mikrosatelitski lokusi in dolžine alelov					
	DCA5	DCA9	DCA11	DCA16	GAPU101	DCA14
Kontrola						
3	189/219	196/198	NA*	162/164	207/220	NA
19	189/219	196/198	146/155	162/164	207/220	201/203
20	189/219	196/198	146/155	162/164	207/220	201/203
21	189/219	196/198	146/155	162/164	207/220	201/203
Obsevane z 10 Gy						
1	189/219	196/198	NA	162/164	207/220	201/203
2	189/219	196/198	NA	162/164	207/220	201/203
7	189/219	196/198	146/155	162/164	207/220	NA
8	189/219	NA	146/155	162/164	207/220	NA
10	189/219	NA	146/155	162/164	207/220	201/203
12	189/219	NA	146/155	162/164	207/220	NA
17	189/219	196/198	146/155	162/164	207/220	201/203
18	189/219	196/198	146/155	162/164	207/220	201/203
Obsevane s 30 Gy						
4	189/219	NA	NA	162/164	207/220	201/203
5	189/219	196/198	146/155	162/164	207/220	NA
6	189/219	196/198	NA	162/164	207/220	201/203
9	189/219	196/198	146/155	162/164	207/220	201/203
11	189/219	196/198	146/155	162/164	207/220	201/203
13	189/219	196/198	146/155	162/164	207/220	201/203
14	189/219	196/198	146/155	162/164	207/220	201/203
15	189/219	196/198	146/155	162/164	207/220	201/203
22	NA	196/198	146/155	162/164	207/220	201/203
23	189/219	196/198	146/155	162/164	207/220	201/203

*NA (not amplified): ni namnožen

Profili vseh šestih mikrosatelitskih lokusov kažejo enake dolžine alelov pri vseh vzorcih. Pri vseh šestih mikrosatelitskih lokusih je bila potrjena heterozigotnost, vendar pa razlike med profili lokusov obsevanih in neobsevanih rastlin nismo zaznali.

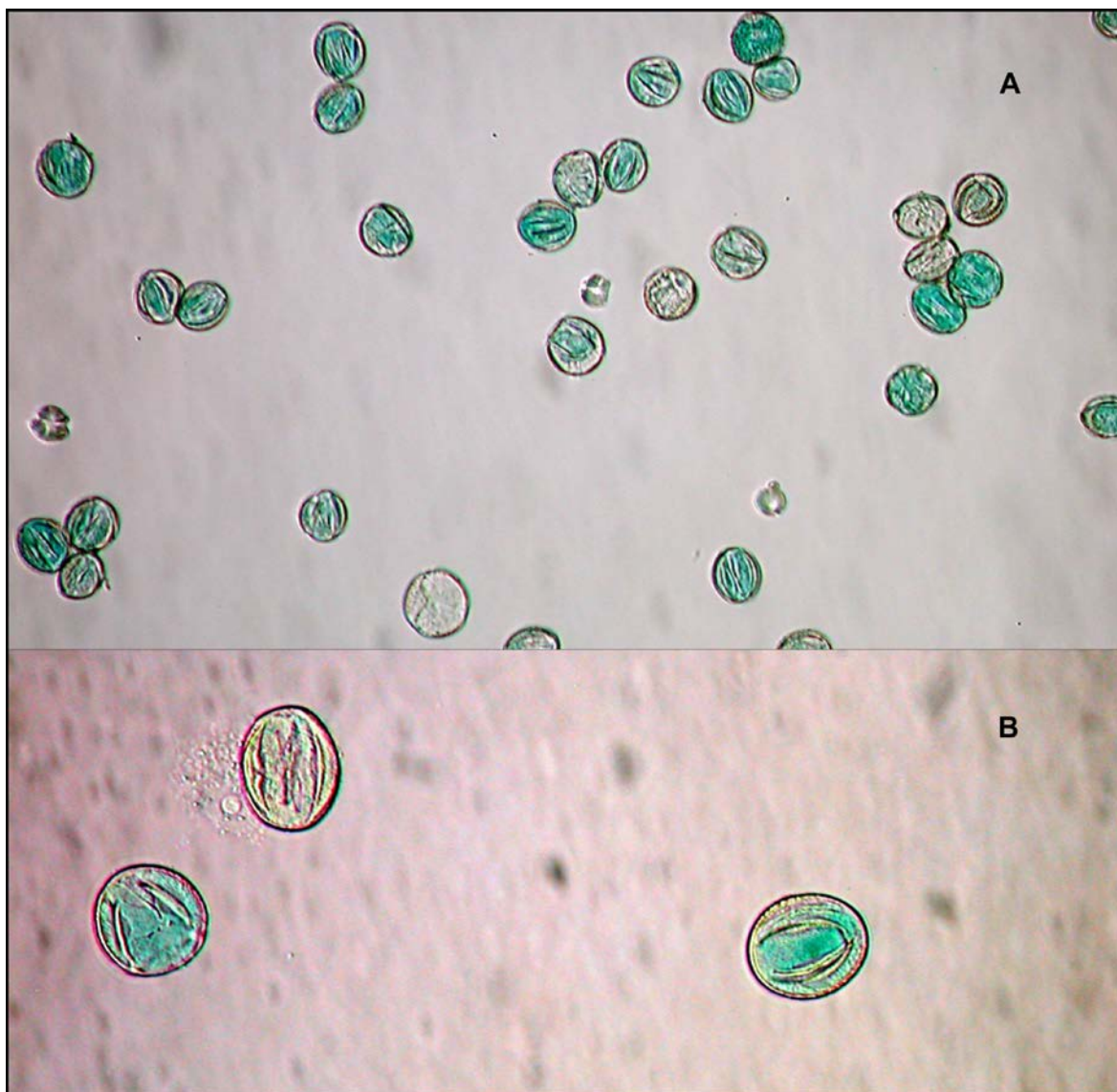
4.6 TRANSFORMACIJA MIKROSPOR Z DOSTAVNIMI PEPTIDI

Za namen transformacije mikrospor z dostavnimi peptidi je bilo opravljenih zelo veliko poskusov. Izkazalo se je, da tehnika ni preprosta, saj je pomembno da za transformacijo izoliramo mikrospore v točno določeni fazi razvoja, torej pozni enojedrni fazi, kar je včasih v praksi zelo težko. Poleg tega je postopek izolacije mikrospor zahteven in časovno zamuden. Za vsako transformacijo z dostavnimi peptidi potrebujemo sveže izolirane mikrospore, kar lahko predstavlja dodatno oviro.

Po združitvi mikrospor in kompleksa (Tat₂ in GUS gen), ki je opisana v točki 3.6.2, je čas inkubacije ključnega pomena, vendar pa točen čas, potreben za tvorbo kompleksa ni znan. Preizkušali smo različna časovna obdobja, v razmaku od 0 do 45 minut, vendar pa je do uspešne transformacije prišlo le nekajkrat in sicer pri inkubacijskem času 15 minut. Po končanem postopku transformacije smo naslednji dan mikrospore analizirali na svetlobnem mikroskopu. Kot je razvidno iz Slike 14, so se transformirane mikrospore obarvale temno modro, netransformirane mikrospore pa niso obarvane.

4.6.1 Rezultati in detekcija transformiranih mikrospor

Pozitivni rezultati transformacije mikrospor so bili doseženi, vendar pa nam nadaljni postopek dozorevanja transformiranih mikrospor ni uspel. Ob uspešni transformaciji celic z GUS genom, ki je odgovoren za sintezo encima β -glukuronidaza, se tkivo z izraženim markerskim genom obarva temno modro.



Slika 14: Transformirane modro obarvane mikrospore tobaka (*Nicotiana tabacum*) in netransformirane mikrospore (neobarvane) pri 10-kratni povečavi (A) in 20-kratni povečavi (B)

Figure 14: Transformation of tobacco (*Nicotiana tabacum*) microspores (blue) and non-transformed microspores (without color) at 10x magnification (A) and 20x magnification (B)

4.7 ADVENTIVNA REGENERACIJA PRI SORTI 'CANINO'

Uspešna adventivna regeneracija v tkivni kulturi je predpogoj za žlahtnjenje rastlin s pomočjo genskih transformacij ali s pomočjo somaklonske variabilnosti. V ta namen smo preizkusili adventivni regeneracijo sorte Canino, ki je bila dostopna v *in vitro* kulturi, ob uspešni fazi indukcije adventivnih struktur, pa bi to znanje lahko prenesli na sorto 'Istrska belica'.

4.7.1 Rezultati optimizacije gojišč

Za indukcijo organogenih struktur smo v letu 2008 preizkusili 12 različnih gojišč. Osnovno gojišče je bilo sestavljeno iz gojišča MS, 20 g/l saharoze, 7 g/l agarja ter pH vrednosti umerjene na 5,5. Temu gojišču smo nato dodali različne rastne regulatorje:

- 20 µM TDZ (tidiazuron) in 0,1 mg/l NAA
- 30 µM TDZ (tidiazuron) in 0,1 mg/l NAA
- 40 µM TDZ (tidiazuron) in 0,1 mg/l NAA

- 20 µM TDZ (tidiazuron)
- 30 µM TDZ (tidiazuron)
- 40 µM TDZ (tidiazuron)

- 20 µM meta-topolin in 0,1 mg/l NAA
- 30 µM meta-topolin in 0,1 mg/l NAA
- 40 µM meta-topolin in 0,1 mg/l NAA

- 20 µM meta-topolin
- 30 µM meta-topolin
- 40 µM meta-topolin

Za izhodiščni material pri poskusu adventivne regeneracije smo izbrali 250 listnih pecljev, 120 listnih izsečkov in 200 internodijev *in vitro* rastline oljke, sorte 'Canino'. Za najbolj obetavno gojišče se je izkazalo osnovno gojišče z dodatkom 40 µM tidiazurona in pa gojišče z dodatkom 40 µM meta-topolinom. Pri teh dveh gojiščih so se listni peclji izkazali kot dober izhodiščni material za adventivno regeneracijo in so po enem mesecu pričeli s tvorbo kalusa, nastalo je tudi nekaj organogenih struktur (Priloga B). Po pričetku tvorbe kalusa smo omenjene listne peclje prestavili na gojišče OM, s 36 g/l manitola, 50 mg/l mioinozitola, 7 g/l agarja in pH vrednostjo 5,8. Po avtoklaviranju pa so bili dodani še rastni hormoni, in sicer 1 mg/l giberelinske kisline in 2 mg/l zeatina. Listni peclji so na novem gojišču porjaveli in prenehali s tvorbo kalusa oziroma organogenih struktur in po mesecu dni propadli.

Ponoven poskus adventivne regeneracije smo izvedli v letu 2009, kjer smo kot izhodiščni material uporabili le 280 listnih pecljev sorte 'Canino', ki so se v prejšnjem poskusu izkazali za najbolj odzivne. Kot osnovno gojišče smo uporabili MS z 20 g/l saharoze, 7 g/l agarja in pH vrednostjo 5,5. Gojišču smo dodali 2 različna citokinina (BAP in zeatin) v različnih koncentracijah:

- | | |
|------------------|---------------------|
| ➤ 20 μ M BAP | ➤ 20 μ M zeatin |
| ➤ 30 μ M BAP | ➤ 30 μ M zeatin |
| ➤ 40 μ M BAP | ➤ 40 μ M zeatin |

Na vseh preizkušanih gojiščih je prišlo do tvorbe kalusa, vendar so listni peclji ob prestavitvi na sveže, identično gojišče po mesecu dni porjaveli in propadli.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 ANALIZA *in vitro* VZPOSTAVITVE TKIVNE KULTURE 'ISTRSKE BELICE'

Prva znana poročila o uspešni mikropropagaciji oljk segajo v sredino 70-ih let prejšnjega stoletja. Raziskovalci so si v tistem času prizadevali za določitev in optimizacijo sestave mineralnega gojišča, ki bo primeren za vzpostavitev tkivne kulture za vse sorte. Najbolj priznana gojišča za mikropropagacijo oljk v sedanjem času so OM gojišče (Rugini, 1984), gojišče MSI, ki je v originalu MS gojišče (Murashige and Skoog, 1962) modificirano s strani Fiorino in Leva (1986) ter gojišče MSM, ki je v originalu prav tako gojišče MS, z nekaterimi modifikacijami raziskovalcev Leva in sod. (1992). Omenjena gojišča naj bi bila splošno primerna za mikropropagacijo oljk, vendar pa se je izkazalo, da ta vseeno niso učinkovita za vse sorte (Grigoriadou in sod., 2002).

Rastni regulatorji so poleg mineralne sestave gojišča druga najbolj pomembna komponenta. Po obsežnih raziskavah in pomembnemu delu raziskovalca Rugini-ja (1984) je bil zeatin splošno sprejet kot edini primeren citokinin, namenjen uspešni mikropropagaciji oljk in vzpostavitvi tkivnih kultur. V splošnem ga uporabljajo v koncentracijah od 4,56 μM do 45,62 μM , odvisno od namena in sorte. Zaradi visoke cene zeatina se v zadnjem času vedno bolj pojavlja težnja po iskanju novih alternativnih možnosti za zamenjavo. O uspešni zamenjavi zeatina so poročali Garcíá-Férriz in sod. (2002), ki naj bi omenjen citokinin nadomestili z tidiazuronom in BAP. Vendar pa je tudi cena tidiazurona precej visoka in tako ugotavljajo, da zamenjava zaenkrat ni smiselna.

Tretja pomembna komponenta v gojišču je vir ogljikovih hidratov, kjer je saharoza v splošnem najbolj primerna in najpogosteje uporabljena za vse podobne namene. V mediju za mikropropagacijo oljk je prišlo do korenitih sprememb, ko je saharozo zamenjal manitol. Leva in sod. (1994) so namreč ugotovili izboljšanje v rasti in neprimerno hitrejšo rast poganjkov, kar lahko upraviči tudi njegovo ceno. O velikih uspehih in pozitivnih učinkih prisotnosti manitola v gojišču poročajo tudi Garcíá in sod. (2002), ki jim je uspelo pridobiti višje poganjke v tkivni kulturi in pa prekinitev apikalne dominanc v poskusih pri sorti 'Manzanillo'.

O uspešnosti koreninjenja, ki je odvisen od sorte in letnega časa, v katerem se izvaja, so že v osemdesetih letih poročali Rugini (1984), Fiorino in Leva (1986) in Rama in Pontikis (1991), ki ocenjujejo da je uspešnost koreninjenja od 25 do 85 %. Za namen razvoja korenin, se v večini primerov uporablja gojišče, obogateno z IBA (indol-3-butrično kislino) ali NAA (α -naftalen očetna kislina) v koncentracijah od 1 do 4 mg/l. Poleg rastnih hormonov v gojišču za koreninjenje je pomembna tudi stopnja zatemnitve gojišča, za katero so Rugini in sod. (1993) ugotovili, da je pomembno vplivala na razvoj korenin in se je odstotek kore-

ninjenja močno povečal. Sprva so bazalni del posode za koreninjenje prebarvali s črno barvo, vendar so v želji po zamenjavi omenjene zamudne metode, kasneje Mencuccini (2003) uvedli barvanje s komercialnim barvilom Brilliant Black (Sigma®). Po novi metodi, z dodajanjem omenjenega barvila, so ti isti avtorji poročali o visoki stopnji koreninjenja, ki je variirala med 86 in 100 %, uporabili pa so jo pri treh italijanskih sortah.

Kljub mnogim raziskavam, ki so bile opravljene v zadnjih desetletjih, in prizadevanji za izboljšanje pogojev v *in vitro* kulturi, je uspeh mikropropagacije še vedno precej nizek in predstavlja veliko omejitev pri nekaterih sortah. Razvoj *in vitro* poganjkov je omejen in sortno specifičen, o čemer poročajo Dimassi-Theriou (1994) in Bartolini in sod. (1990), razvoj adventivnih korenin pri večini sort pa še vedno zelo težaven. Dodaten problem pa je tudi aklimatizacija že ukoreninjenih *in vitro* rastlin, ki prav tako predstavlja velike izgube (Briccoli-Bati in sod., 1999; Rugini in sod., 1999).

V našem poskusu vzpostavitve tkivne kulture, se je 'Istrska belica' v začetku izkazala za precej neodzivno sorto. Pri izbiri materiala smo bili omejeni na enoletne poganjke, ki so v razvoju in imajo že vidne zalistne brste. To je predstavljalo hudo časovno omejitev, saj smo omenjeni material lahko pridobili le v določenem delu leta, to je konec marca oziroma v začetku aprila. Sprva smo rastlinski material nabirali v nasadu v kraju Osp, vendar se je kasneje izkazalo da le-ta ni primeren, saj je bila okuženost nodijskih izsečkov v *in vitro* kulturi skoraj 100 %. Po nakupu sadik 'Istrske belice', smo ponovno začeli s poskusi vzpostavitve tkivne kulture. Izkazalo se je, da je izbira materiala, ki raste v kontroliranih razmerah in zaprtih prostorih v našem primeru neprimerno boljša. Opazili smo manjšo okuženost izsečkov, saj so bile rastline tretirane s fungicidi in pesticidi. Za tretiranje sadik v rastlinjakih smo uporabili fungicide Ridomil®, Switch®, Bayleton® in Cuprablau Z WP® ter insekticide Confidor®, Karate Zeon® in Chess 50 WG®.

S postopkom preverjanja endogenih okužb smo ugotovili, da gre za pojav endofitskih gliv, ki najverjetneje predstavljajo glavno oviro pri vzpostavitvi tkivne kulture 'Istrske belice'. Do rezultatov identifikacije smo prišli z izolacijo DNA gliv, ki so se pojavile na gojiščih za glive, kamor smo prenesli razrezane in sterilne nodijske izsečke. Glive, ki so se v omenjenem gojišču namnožile v prvih dneh niso bile endofitske, saj se je izkazalo, da gre za pojav glive *Chaetomium*, ki je prisotna povsod okrog nas. V drugih primerih, ko so glive pričele z rastjo po več kot štirih tednih na omenjenem gojišču, pa smo potrdili, da gre za endofitske glive, ki se nahajajo znotraj izsečkov, v prevodnih tkivih. Glive *Chaetomium globosum*, *Biscogniauxia nummularia*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Cladosporium* sp. MS-2011-F14, *Preussia* sp. 1 ICMP 18937 in *Sistotrema brinkmannii* strain ATTC 26295 so definirane kot endofitske glive, ki se največkrat pojavljajo pri drevesnih vrstah. Pri oljki je o endofitskih mikroorganizmih znanega zelo malo, je pa podatek o prisotnosti endofitov lahko ključnega pomena v nadaljnjih raziskavah. Znano je namreč, da endofiti lahko tudi negativno vplivajo na rast in razvoj rastlin, ob izpostavitvi različnim stresnim dejavnikom.

Sklepamo, da je informacija o endofitskih glivah, ki smo jih identificirali v našem primeru ključnega pomena za nadaljne raziskave pri sorti 'Istrska belica', saj so najverjetneje glavni razlog za težavnost pridobivanja tkivne kulture. S poznavanjem gliv in njihovo eliminacijo smo tako bližje pridobivanju akseničnih poganjkov in zdravih rastlin, saj lahko z nadaljnim testiranjem izsečkov v tkivni kulturi ocenimo delež prenosa endogenih gliv v tkivno kulturo in pa razvijemo uspešen protokol za eliminacijo.

V fazi iniciacije smo tekom poskusov prišli do pomembnih informacij, katerim je sledila uspešna vzpostavitev tkivne kulture naše sorte. Velik problem je predstavljala porjavelost tkiv, kateri je vedno sledil propad izsečkov. Ker je oljka drevesna vrsta z naravno visoko vsebnostjo fenolov je tkivo podvrženo hitri oksidaciji, kateri sledi nekroza in propad tkiv. To smo uspešno premostili z namakanjem izsečkov v raztopini askorbinske in citronske kisline. V našem primeru se je ta metoda izkazala za ključno, saj smo ob uvedbi namakanja v antioksidantih uspeli pridobiti prve poganjke in visok delež neporjavelih izsečkov. Druga pomembna metoda je bila namakanje izsečkov v 70 % etanolu za eno minuto, pred nadaljnim razkuževanjem z dikoroizocianurno kislino. Kljub temu, da novejša metode sterilizacije izključujejo uporabo etanola zaradi možnosti dehidracije tkiva, se je v našem primeru izkazalo, da je za našo sorto ta metoda najbolj uporabna, saj smo zaznali manjši delež okužb v začetni fazi vzpostavitve tkivne kulture.

Pri izbiri gojišča smo se najprej osredotočili na gojišča, ki so bila uporabljena v podobnih raziskavah pri drugih sortah. Uporaba gojišča OM v fazi iniciacije se v našem primeru ni izkazala za najbolj optimalno. Kljub preizkušanjem različnih variacij omenjenega gojišča nismo uspeli uspešno zaključiti faze iniciacije. Kljub vidnim poganjkom, ki so bili zelo majhni, nismo uspeli vzpostaviti tkivne kulture, saj se je po prestavitvi poganjkov na identično, sveže gojišče, pojavila porjavelost tkiva, kateri je sledil propad izsečkov. Po preizkusu gojišča DKW (Driver in Kuniyuki, 1984), kateremu smo dodali zeatin ribozid (4 mg/l), smo prvič uspešno pridobili zdrave in primerno velike poganjke, ki so bili nato premeščeni na gojišče za izdolževanje. Iz uspešnega poskusa z gojiščem DKW lahko sklepamo, da je to gojišče v fazi iniciacije za našo sorto najbolj optimalno. Prav tako lahko sklepamo, da je v našem primeru zeatin ribozid primernejši citokinin kot 2iP, saj smo pri gojišču z dodatkom zeatin ribozida pridobili večje število daljših poganjkov.

Za izdolževanje poganjkov smo na podlagi podobnih in uspešnih protokolov (Zacchini in sod., 2004), ki so že ustaljeni za pridobivanje *in vitro* kulture nekaterih drugih sort, izbrali gojišče OM z dodatkom zeatin ribozida (4,8 mg/l) in giberelinske kisline (1,49 mg/l). Omenjeno gojišče se je izkazalo za uspešno tudi v primeru sorte 'Istrska belica'. Pridobili smo lepe in zdrave poganjke, ki so bili kasneje razrezani na enodelne nodijske segmente in prestavljeni na gojišče za razmnoževanje.

Gojišče za razmnoževanje je bilo identično tistemu, ki ga uporabljamo za mikropropagacijo sorte 'Canino'. Sestavljeno je iz gojišča OM, z dodatkom zeatin ribozida (2 mg/l) in giberelinske kisline (1 mg/l). S tem gojiščem smo uspešno vzpostavili tudi mikropropagacijo 'Istrske belice'.

5.2 ANALIZA UPORABE IONIZIRAJOČEGA SEVANJA ZA NAMEN ŽLAHTNJE-NJA OLJKE

Ionizirno sevanje prehaja v tkivo, globina prehajanja pa se za določen tip sevanja povečuje vzporedno z njegovo energijo. Ko sevanje prehaja v tkivo, se v njem uskladišči nekaj njegove energije. Vsa energija, ki jo tkivo prejme s sevanjem, se širi kot toplota, to je preko povečane vibracije atomske in molekulske strukture. Ionizirno sevanje vpliva na vse celice, tudi na spolne in zato povzroča genetske in somatske spremembe

V prvi polovici prejšnjega stoletja so raziskave pokazale da obsevanje rastlin z X-žarki povzroča spremembe na tkivih in pri nekaterih vrstah močno zavira rast, večina opisanih sprememb pa je bolj kot ne destruktivne narave. Tipičen primer takšnih opažanj sta v svojem poročilu opisala McKay in Goodspeed (1930), ki sta z X-žarki obsevala pelod bombaža. Z obsevanim pelodom sta oprasila rastline ter iz plodov tretiranih rastlin pridobljena semena znova posadila in opisala morfološke spremembe na vzgojenih rastlinah. Poročata o zavirani rasti in zmanjševanju števila semen v plodovih s povečevanjem doze sevanja.

Razvoj molekularnih metod in vzpostavitev *in vitro* kulture rastlin v sedanjem času odkrivata povsem nove možnosti uporabe sevanja za različne namene. Z razvojem *in vitro* kulture rastlin se je uporaba količine sevanja za izzivanje mutacij zelo zmanjšala, saj za obsevanje nekaj miligramov tkiva potrebujemo precej nizke doze sevanja. Posebnega pomena pa je tudi identifikacija in analiza mutantov, ki je v današnjem času z uporabo molekularnih tehnik z iskanjem prstnih odtisov DNA in analizo s PCR markerji, kot so RAPD, AFLP in SSR povsem dostopna in odkriva nove možnosti za uporabo tovrstnih mutacij.

Radiosenzitivnost pomeni občutljivost tkiv na količino prejetega sevanja izbranega tkiva in pri oljki do sedaj še ni bila določena. V literaturi najdemo precej skromne zapise o uporabi sevanja za namen žlahtnjenja oljke. Za najbolj uspešno uporabo sevanja pri žlahtnjenju oljk še vedno velja raziskava Donini in sod. (1972) ki so z uporabo gama žarkov s sevalno dozo 40 Gy obsevali potaknjence sorte 'Ascolana' in 'Moraiolo'. To je bilo tudi uvodno delo pri registraciji nove sorte z imenom 'Briscola', ki so jo Donini in sod. (1982) pridobili z obsevanjem dormantnih brstov sorte 'Ascolana' z gama žarki in sevalno dozo 40 Gy. Novo pridobljena sorta je bila po opisih sodeč dobro rastoča, z zgodnjim cvetenjem in dozorevanjem plodov.

V našem poskusu z obsevanjem *in vitro* rastlin sorte 'Canino' smo rastline obsevali z uporabo filtra aluminijaste folije in pa brez uporabe filtrov. Rastline smo morfološko ovredno-

tili tako, da smo jih izmerili in stehali pred obsevanjem in pa mesec dni po obsevanju ter ocenili stopnjo koreninjenja tik pred aklimatizacijo. V Preglednici 3 in 4 so zapisani podatki morfoloških meritev, ki kažejo na to, da je pri sevanju z uporabo filtra (aluminijasto folijo) prišlo do nekaterih razlik v primerjavi z obsevanimi rastlinami brez uporabe filtra. Prva opazna razlika je odstotek koreninjenja, ki je pri rastlinah obsevanih z uporabo filtra nekoliko višji, korenine pa so se pojavile tudi pri rastlinah obsevanih s sevalno dozo 60 Gy. Predvidevamo da gre za rahel učinek stimulacije X-žarkov, ki je bil dosežen z uporabo filtra, saj je znano da tovrstni filtri močno absorbirajo dolge valovne dolžine sevanja in jih praktično odstranijo iz sevalnega spektra. Pri obsevanih rastlinah brez uporabe filtrov poganjki, obsevani s sevalno dozo 60 Gy, niso preživel in so takoj propadli. Druga opazna sprememba je teža poganjkov, ki se je pri obsevanju s filtrom pri najvišji dozi zmanjšala za 36 %, pri obsevanju brez filtra pa je prišlo do popolnega zastoja rasti. S statistično analizo podatkov (ANOVA in Duncan test) smo ugotovili, da se morfološke meritve teže poganjkov pri obsevanju brez uporabe filtra aluminijaste folije statistično razlikuje, prav tako se statistično razlikujejo tudi parametri izmerjene višine poganjkov (Preglednica 4). Pri analizi podatkov morfoloških meritev teže pri rastlinah, obsevanih z uporabo filtra aluminijaste folije, se statistične razlike kažejo pri obsevanju s sevalno dozo 60 in 10 Gy, med 0 in 30 Gy pa statistično značilnih razlik nismo zaznali. Pri morfoloških meritvah višine poganjkov, se statistično značilne razlike kažejo pri obsevanju med sevalno dozo 60 in 30 Gy, med sevalno dozo 10 in 0 Gy, pa statistično značilnih razlik ni (Preglednica 3). V statistični obdelavi podatkov (ANOVA in LSD test) smo želeli ovrednotiti tudi razlike med dozami obsevanja brez ali z uporabo filtra aluminijaste folije. Pri obsevanju s sevalno dozo 10 Gy med obsevanjem z ali brez uporabe filtra statistično značilnih razlik ni, medtem ko pri sevalni dozi 30 Gy med obsevanji z ali brez uporabe filtra, statistično značilne razlike so. Iz tega lahko sklepamo, da je pri sevalni dozi 30 Gy z ali brez uporabe aluminijastega filtra, kjer so razlike statistično značilne, prišlo do absorpcije dolgovalovnih dolžin sevanja X-žarkov, kar smo dosegli z uporabo aluminijastega filtra. Za nadaljno določitev optimalne sevalne doze za namen žlahtnjenja oljke bi bilo tako potrebno opraviti dodatne raziskave in pa natančna umeritev inštrumenta za ionizirajoče sevanje.

Iz opisanih parametrov morfoloških lastnosti obsevanih *in vitro* poganjkov z uporabo treh različnih doz sevanja lahko sklepamo, da pri uporabi sevalne doze 10 Gy ni prišlo do zavi-ranja rasti poganjkov, medtem ko je sevalna doza 60 Gy močno prizadela rast poganjkov in precej zmanjšala zmožnost koreninjenja. Vse preživele rastline s prejeto dozo 60 Gy, so kasneje, v obdobju aklimatizacije propadle. V tem primeru bi lahko sevalno dozo 60 Gy označili za letalno dozo (LD_{50}), saj so vse rastline propadle. Naši rezultati se precej ujema-jo s podobnimi raziskavami na drugih vrstah rastlin, kjer so denimo pri lotusu, *in vitro* kul-turo obsevali z gama in X-žarki s sevalno dozo 60 Gy (Arunyanart and Soontronyatara 2002). Poročali so o visoki stopnji poškodb poganjkov in nezmožnosti koreninjenja ob uporabi visokih sevalnih doz, pri uporabi X-žarkov in sevalne doze 20 in 30 Gy, pa se rezultati močno ujemajo z našimi. Iz pridobljenih rezultatov lahko sklepamo, da je sevalna

doza 10 Gy zelo primerna za izzivanje mutacij pri oljki, saj smo z analizo z molekulskimi markerji zaznali največ polimorfni fragmentov. Kljub temu, da se obsevane rastline s sevalno dozo 10 Gy pri morfoloških meritvah niso bistveno razlikovale od kontrolnih rastlin, je analiza z molekulskimi markerji pokazala povsem drugačno sliko, kar je pomembna informacija za nadaljno uporabo sevanja za namen žlahtnjenja oljke.

5.3 OCENA MERITEV VELIKOSTI GENOMA S PRETOČNO CITOMETRIJO

Pretočna citometrija temelji na analizi relativne intenzitete fluorescence jeder, pobarvanih s fluorokromi. Suspenzija posameznih jeder v toku teče prko žarišča vzbujajoče svetlobe. Ob osvetlitvi jedra s fluorokromi, vezani na DNA, sevajo svetlobo, ki jo zaznamo z optičnim detektorskim sistemom, intenziteta sevanja svetlobe pa je sorazmerna s količino DNA (Vilhar in sod., 2001).

V oceno meritev velikosti genoma je bilo vključenih 19 obsevanih rastlin. Čeprav je bilo po končanem obsevanju ukoreninjenih in aklimatiziranih 23 rastlin, je v času ko smo pobirali vzorce za analizo s pretočno citometrijo prišlo do odmrtja štirih že aklimatiziranih rastlin. Za merjenje velikosti genoma smo uporabili sveže nabrane liste obsevanih rastlin, za vsako rastlino pa smo opravili 3 ponovitve. Izmerjena velikost genoma neobsevanih rastlin znaša 2,972 pg/jedro in se ujema s predhodnimi meritvami genoma oljke, ki so jo opravili Loureiro in sod. (2007). V svoji raziskavi so izmerili velikost genoma šestih sort. Njihova izmerjena vrednost je pokazala velikost genoma od 2,90 do 3,07 pg.

Rezultati meritev velikosti genoma s standardno deviacijo na posamezno dozo sevanja so prikazani v Preglednici 5. Na podlagi pridobljenih podatkov lahko sklepamo, da je povečevanje doze sevanja vplivalo na manjše spremembe v velikosti genoma, posebno pa je to opazno pri rastlinah, s prejeto dozo sevanja 30 Gy. O podobnih primerih zmanjšanja velikosti genoma poročajo tudi pri drugih vrstah. Yamaguchi in sod. (2010) tako poročajo o zmanjšani velikosti genoma pri krizantemah, obsevanih z gama žarki in sevalnimi dozami 10, 20 in 30 Gy.

Ker do večjih odstopanj v velikostih genoma obsevanih rastlin, tudi pri sevalni dozi 30 Gy ni prišlo, sklepamo, da je uporabljena metoda pretočne citometrije primerna za uporabo v nadaljnjih poskusih žlahtnjenja, saj bi lahko večje delecije v genomu neugodno vplivale na rast in razvoj rastlin. Sklepamo, da je do zmanjšanja genoma lahko prišlo zaradi nekaj večjih delecij v genomu, ali pa so pridobljeni rezultati zgolj naključje.

5.4 ANALIZA MARKERJEV AFLP

Dostopnih raziskav o molekularski karakterizaciji mutacij, pridobljenih z obsevanjem, je pri oljki zelo malo. Rawashdeh (2003) je za analizo obsevanih potaknjencev z različnimi

dozami gama žarkov uporabil 20 kombinacij začetnih oligonukleotidov, vendar pa se je polimorfizem pokazal le pri enem fragmentu. To pa je do sedaj tudi edino znano poročilo o uporabi molekularnih tehnik za zaznavanje mutacij pri oljki.

V naši raziskavi smo za detekcijo mutacij, pridobljenih s sevanjem X-žarkov, uporabili 23 obsevanih in ukoreninjenih rastlin. Za izolacijo DNA smo uporabili novonastale sveže liste omenjenih rastlin.

Pri analizi z AFLP markerji smo skupno zaznali 630 fragmentov, ki so bili namnoženi s 13-imi kombinacijami začetnih oligonukleotidov. Od vseh zaznanih fragmentov je bilo 179 polimorfni kar nakazuje na 28,4 % polimorfizem. Pridobljeni podatki se ujemajo z novjšimi raziskavami pri drugih vrstah rastlin. Rashid in sod. (2009) so po obsevanju suhih semen Basmati riža za analizo z markerji AFLP uporabili 16 kombinacij začetnih oligonukleotidov, ki so skupno namnožili 282 fragmentov, od katerih je bilo polimorfni kar 180 (37,8 %). O polimorfizmu pa poročajo tudi Lu in sod. (2007), ki so z različnimi dozami gama žarkov obsevali *in vitro* poganjke narcis in za analizo AFLP uporabili 13 kombinacij začetnih oligonukleotidov. S temi kombinacijami so uspešno namnožili 521 fragmentov, od katerih je bilo 7,87 % polimorfni pri sevalni dozi 10 Gy, končni polimorfizem, kot poročajo avtorji, pa je znašal 15,5 %.

Visok delež odsotnih fragmentov se je pokazal pri sevalni dozi 10 Gy, kjer smo zabeležili 252 odsotnih fragmentov v primerjavi s kontrolnimi, neobsevanimi rastlinami. Delež novonastalih fragmentov pa je bil višji pri sevalni dozi 30 Gy, kjer smo zabeležili 165 novih fragmentov, zopet v primerjavi s kontrolnimi rastlinami. Ugotavljamo, da je opisan pojav novonastalih in odsotnih fragmentov lahko posledica dveh različnih doz sevanja. Pričakovati je, da nižje doze sevanja povzročajo manjše genetske spremembe na nivoju nukleotidov, ki vplivajo na ciljno mesto za restrikcijske encime, in je s tem povečan pojav tako novonastalih, kot odsotnih fragmentov pričakovan. Visoke sevalne doze pa lahko povzročijo tudi večje poškodbe molekule DNA, vključno z manjšimi delecijami, in bi s tem lahko vplivale na zmanjšanje ciljnega mesta za restrikcijske encime. Te predpostavke temeljijo na rezultatih, ki smo jih pridobili s pretočno citometrijo, in so v našem primeru pokazali rahlo zmanjšanje velikosti genoma pri uporabi sevalne doze 30 Gy.

Zaključimo lahko, da so se AFLP markerji pri oljki izkazali kot zelo občutljiva metoda za detekcijo mutacij, ki so posledica obsevanja. Poudariti moramo tudi dejstvo, da pri sevalni dozi 10 Gy, negativnih morfoloških sprememb zaenkrat nismo zaznali, medtem ko je analiza z markerji AFLP pokazala precejšnje razlike. Iz tega lahko sklepamo, da so za nadaljnje opazovanje morebitnih morfoloških sprememb mutantov posebej pomembni tisti, ki so obsevani z nizko sevalno dozo.

5.5 ANALIZA MIKROSATELITSKIH MARKERJEV

O uporabi mikrosatelitov za namen detekcije mutacij, pridobljenih z obsevanjem, je do sedaj opravljenih zelo malo raziskav. Na oljki tovrstne študije zaenkrat še ni bilo. Novejša raziskava je bila leta 2011 opravljena na drevesih bora (*Pinus sylvestris*) v Černobilu, ki so bila izpostavljena konstantnemu sevanju v času černobilske nesreče v letu 1986. Kuchma in sod. (2011) so za analizo in detekcijo mutacij uporabili AFLP in mikrosatelitske markerje. V svojo analizo so vključili 50 let stara drevesa bora, v mestu Pripjat, ki so bila v starosti 30 let izpostavljena velikim dozam sevanja v času jedrske nesreče. Kontrolna skupina je zajemala drevesa, stara 20 let, ki so bila posajena po nesreči in neposredno niso bila izpostavljena velikim dozam radioaktivnega sevanja. Avtorji poročajo, da so z mikrosatelitskimi markerji zaznali le nekaj mutacij pri enem drevesu, ki je bilo kronično izpostavljeno radiaciji. Predvidevajo, da je majhno število mutacij, ki so jih zaznali z mikrosatelitskimi markerji najverjetneje posledica večih faktorjev. Mikrosateliti so vezani na genske regije, in imajo funkcijsko vlogo, ki je regulirana z mnogimi mehanizmi. Ob daljši izpostavitvi stresnim dejavnikom, kot je denimo kronično sevanje, se s selekcijskim pritiskom vzpostavi mehanizem, ki je odgovoren za prilagajanje organizma na obstoječe razmere in popravi poškodbe na molekuli DNA. Prav zato so spremembe, ki jih je moč zaznati z mikrosatelitskimi markerji zelo majhne. V majhnem številu zaznanih mutacij, pa avtorji poročajo izključno o delecijah znotraj ponavljajočih se motivov mikrosatelitov. S sočasno analizo z markerji AFLP pa so avtorji odkrili visok odstotek polimorfnih fragmentov, ki se je izrazil kot pojav novih ali odsotnost obstoječih fragmentov v primerjavi s kontrolnimi rastlinami.

V naši raziskavi smo za zaznavanje mutacij, ki so posledica obsevanja uporabili mikrosatelitske markerje na podlagi uspešnih raziskav, ki so bile izvedene na drugih vrstah rastlin. Kovalchuk in sod. (2000) poročajo o uspešni uporabi mikrosatelitskih markerjev za odkrivanje mutacij pri pšenici. Pšenica je bila posajena na onesnaženih tleh 10 mesecev po černobilski nesreči in je bila tako izpostavljena konstantnim, manjšim dozam sevanja. Avtorji poročajo o visokem odstotku mutacij, odkritih na 13-ih lokusih mikrosatelitov. Mutacije so bile izražene kot popolna odsotnost mikrosatelitskih lokusov, ali pa kot delna odsotnost ponavljajočih se motivov (delecije). O prav tako uspešni uporabi mikrosatelitov za namen odkrivanja mutacij poročajo Vornam in sod. (2004), ki so v svoji analizi zajeli drevesa bora, ki so v času od leta 1986 – 2002 prejeli dozo sevanja med 70 in 75 Gy v prvi regiji in pa drevesa s prejeto sevalno dozo med 25 in 28 Gy v drugi regiji. Avtorji tudi v tej študiji poročajo o uspešnem zaznavanju mutacij z mikrosatelitskimi markerji. V obeh študijah poudarjajo, da so visoke stopnje odkritih mutacij, ki so jih zaznali z mikrosatelitskimi markerji najverjetneje posledica kronične izpostavljenosti sevanju, ki je bila v obeh primerih, več kot 20 let.

V našem poskusu detekcije mutacij obsevanih rastlin z mikrosatelitskimi markerji nismo zaznali razlik v profilih namnoženih lokusov. V Preglednici 7 so podatki o uporabljenih

mikrosatelitskih lokusih in analiziranih dolžinah alelov. Iz rezultatov je razvidno, da se dolžine alelov med obsevanimi akcesijami in kontrolo za posamezni lokus ne razlikujejo, kar pomeni da mutacij s sistemom mikrosatelitskih markerjev nismo zaznali. Glede na dostopne raziskave, ki za namen detekcije mutacij uspešno uporabljajo mikrosatelitske markerje, lahko sklepamo, da v našem primeru mutacij z markerskim sistemom nismo zaznali ravno zaradi akutne (kratkotrajne) izpostavljenosti sevanju, ki se močno razlikuje od dolgotrajne, kronične izpostavljenosti, o kateri poročajo zgoraj omenjeni avtorji. Iz tega lahko sklepamo, da mikrosatelitski markerji, ki so v splošnem zelo uporabni za različne genetske študije, niso najbolj primeren sistem za odkrivanje mutacij pri akutno obsevanih rastlinah oljk.

Mikrosatelitski markerji zajemajo precej širok spekter uporabe. Največkrat je uporaba mikrosatelitov namenjena za genetsko identifikacijo na nivoju sorte, manj pa je primerna za določitev klonske variabilnosti (Sefc in sod., 2000). O uspešni določitvi klonske variabilnosti pri oljki poroča le nekaj avtorjev. Gomes in sod. (2008) poročajo o uspešni uporabi štirih mikrosatelitskih lokusov, ki so namnožili od 3 do 5 alelov/lokus in tako zaznali variabilnost znotraj klonov sorte 'Verda-Transmontana'.

Mikrosatelitni profil naše preučevane sorte 'Canino', ki je predstavljen v Preglednici 7, smo primerjali s profilom pridobljenim v bazi mikrosatelitskih podatkov za oljko (Oleadb.it – www.oleadb.it), ki se nanašajo na sorto 'Canino' iz Španije (Baldoni in sod. 2009). Med štirimi lokusi, ki so bili dostopni za primerjavo, smo odkrili razlike na dveh lokusih (DCA5 in DCA9), medtem ko sta bila alelna profila lokusov DCA16 in GAPU101 enaka. Pri lokusu DCA5 je razlika v dolžini alelov znašala 26 baznih parov, pri lokusu DCA9 pa 10 baznih parov. O nekaterih razlikah med mikrosatelitskimi profili poročajo tudi novejša raziskave na sorti 'Canino'. Gismondi in sod. (2013) so za identifikacijo 39-ih dreves oljk, ki so pripadale 13-im različnim sortam, uporabili 5 mikrosatelitskih lokusov. Avtorji poročajo o uspešnosti identifikacije vseh 39-ih primerov oljk, poudarjajo pa, da so s filogenetsko študijo ugotovili, da sorta 'Canino' predstavlja predhodno sorto vseh obravnavanih sort na preučevanem območju, in se deli na dve podskupini. Prav tako o različnih profilih mikrosatelitskih markerjev poročajo Colao in sod. (2011). Avtorji so v svoji raziskavi želeli identificirati 24 različnih sort v centralni Italiji, z uporabo 18-ih mikrosatelitskih markerjev. Vse sorte so bile vzorčene trikrat in prav tako tudi ponovitve analize za vsak mikrosatelitski lokus. Avtorji poročajo o uspešnosti uporabljenih mikrosatelitskih lokusov za identifikacijo sort, obenem pa poudarjajo, da so pri trikratnem testiranju sorte 'Canino' uspešno zaznali mutanta omenjene sorte. Iz navedenega sklepamo, da se naša preučevana, italijanska sorta 'Canino', razlikuje od španske sorte 'Canino', kar kaže na to, da je 'Canino' najverjetneje ena starejših sort oljke (Gismondi in sod., 2013), pri kateri se je v dolgem obdobju kultiviranja akumuliralo veliko število mutacij.

Sklepamo lahko tudi, da je sevalna doza 10 Gy v primeru oljke zelo primerna za izzivanje mutacij na nivoju DNA, saj smo z molekulskimi markerji AFLP pri omenjeni sevalni dozi zaznali največje število novih in odsotnih fragmentov, medtem ko pri morfoloških meritvah do bistvenih razlik med kontrolo in obsevanimi rastlinami z enako sevalno dozo (10 Gy), večjih razlik nismo zaznali.

5.6 OCENA PRIMERNOSTI POSTOPKA TRANSFORMACIJE Z DOSTAVNIMI PEPTIDI

S poskusi transformacije smo pričeli v letu 2010. Testno rastlino, v našem primeru tobak, smo izbrali zaradi enostavnega postopka vzgoje *in vitro*, koreninjenja in aklimatizacije, ki je pri omenjeni rastlini zelo uspešna.

V začetku našega preučevanja novih metod za namen žlahtnjenja oljke smo zasledili zanimive raziskave o transformaciji celic z dostavnimi peptidi. Tekom raziskave smo vzpostavili sodelovanje z vodilnim raziskovalcem na omenjenem področju, dr. François Eudesom, ki svoje raziskave opravlja z ožjimi sodelavci na Inštitutu za kmetijstvo v mestu Lethbridge v Kanadi. Leta 2007 je njegova raziskovalna skupina kot prva poročala o uspešni transformaciji mikrospor tritikale z GUS genom. Leto zatem, pa sta avtorja poročala tudi o uspešni transformaciji protoplastov tobaka, prav tako z GUS genom (Chugh in Eudes, 2008). V svojih raziskavah so testirali tudi različne dostavne peptide in ugotavljajo, da naj bi bil za uporabo transformacije mikrospor najbolj primeren dimer peptida Tat, torej dostavni peptid Tat₂.

Namen naše raziskave o transformaciji z dostavnimi peptidi je bil pridobiti uspešen protokol za hitro transformacijo mikrospor tobaka, ki bi se nato lahko uspešno razvil tudi pri oljki. S spoznavanjem omenjene metode transformacije smo prišli do pomembnih ugotovitev. Pri izolaciji tobaka smo zelo hitro lahko ocenili velikost cvetov, kar je pomembno za pridobitev mikrospor v pozni enojedrni fazi. Tudi sam postopek izolacije po protokolu Touraev in sod. (1999) smo hitro obvladali. Večjo oviro je predstavljala priprava celičnih dostavnih peptidov za transformacijo. Pri transformaciji mikrospor smo največkrat uporabljali le peptid Tat₂, ki se je tudi po poročanju drugih avtorjev izkazal kot najbolj optimalen (Chugh in Eudes, 2008). Razredčen peptid smo v zahtevani koncentraciji za vsako transformacijo pripravili s sveže pripravljenimi raztopinami in pufri, da bi se izognili nekaterim omejujočim dejavnikom pri tvorjenju kompleksa. Isti protokol smo uporabili tudi pri pripravi GUS gena. Ko je nastopil čas inkubacije kompleksa, ki je bil sestavljen iz Tat₂ peptida in pa GUS gena, se je izkazalo, da v tej stopnji pride do odločilne faze, saj čas, potreben za uspešno tvorjenje kompleksa ni poznan. Na tej stopnji smo opravili več kot sto poskusov, kjer smo preizkušali različne časovne intervale za tvorjenje kompleksa. Na začetku smo preizkušali časovne intervale v razponu od 0 do 10 minut, vendar smo po neuspešnih poskusih čas tvorjenja podaljšali na 15 minut. Na Sliki 12 je prikazan uspešen poskus

transformacije mikrospor tobaka z dostavnimi peptidi in GUS genom. Slike smo pridobili po 15 minutnem inkubacijskem času kompleksa, vendar pa je bila ponovljivost v nadaljnjih poskusih slaba. Modre, transformirane mikrospore so se pojavljale redko, in uspešna transformacija, z visokim deležem modro obarvanih mikrospor, je bila dosežena le nekajkrat. Sklepamo, da je pri tovrstni transformaciji, čas za tvorjenje kompleksa ključnega pomena. V naših poskusih smo ugotovili, da je problematična tudi sama priprava celičnih peptidov za namen transformacije, in predvidevamo da je to glavni vzrok slabe ponovljivosti rezultatov.

Namen razvoja uspešnega postopka za transformacijo mikrospor tobaka je bil predvsem ta, da bi uspešen protokol lahko pričeli uporabljati pri oljki. Za uspešno transformacijo mikrospor pa je seveda zelo pomemben tudi protokol za regeneracijo, ki je pri tobaku zelo dobro poznan, pri oljki pa o uspešni regeneraciji mikrospor poroča zelo malo avtorjev.

Bueno in sod. (2005) so preizkušali regeneracijo mikrospor oljke sorte 'Arbequina', s katerimi so želeli pridobiti haploidne embrije. Postopek regeneracije mikrospor ocenjujejo kot zelo dolgotrajen, saj so prve delitve celic zaznali šele 4 tedne kasneje. Sočasno poudarjajo, da je oljka za ta namen precej neodzivna vrsta, pridobitev haploidnih embrijev pa ni bila uspešna.

Pri genetski transformaciji oljk so bili do sedaj večinoma uporabljeni *rol* geni bakterije *A.rhizogenes*, ki so bili prek T-DNA klonirani v bakterijo *A.tumefaciens*LBA4404. Transformacija s celotno T-DNA bakterije *A.rhizogenes* lahko učinkovito pospešuje koreninjenje, vendar so bile do sedaj pridobljene le himerne rastline (Rugini, 1992). *Rol* ABC geni lahko spremenijo morfološke znake rastlin, vendar pa so somatske embrije in rastline zaenkrat pridobili le iz sorte 'Canino' (Rugini in sod., 1999), saj pri ostalih sortah regeneracija ni bila mogoča.

Dostavni peptidi, ki so s svojo uporabnostjo v farmakologiji in medicini prispevali k ogromnemu napredku, so se na področju rastlin v zadnjih letih raziskovanja izkazali kot uspešen in perspektiven sistem za transformacijo celic. Iz lastnih poskusov lahko sklepamo, da se ob razvoju optimalnega protokola za raziskovano vrsto rastlin lahko doseže uspešno transformacijo celic. Znanje, ki smo ga pridobili v poskusih transformacije mikrospor tobaka bi v prihodnosti lahko ob sočasni, uspešni regeneraciji mikrospor oljke prenesli tudi na to vrsto rastlin. Dostavni peptidi raziskovalcem predstavljajo velik izziv, saj je na področju transformacije pri rastlinah ogromno možnosti, katerih področje še ni raziskano.

5.7 POMEN IN ANALIZA POSKUSA ADVENTIVNE REGENERACIJE PRI SORTI 'CANINO'

Adventivna regeneracija omogoča hitro klonsko razmnoževanje rastlin in tudi njihovo žlahtnjenje z izkoriščanjem pojava somaklonske variabilnosti ter genskih transformacij. Uporabnost adventivne regeneracije za žlahtnjenje rastlin v prvi vrsti določa način nastanka adventivnih brstov, saj je pri posredni regeneraciji (iz brstov, nastalih na kalusnem tkivu) somaklonska variabilnost bolj pogosta. Z izkoriščanjem pojava somaklonske variabilnosti pri okrasnih rastlinah so požlahtnili rastline s spremenjenim habitusom, obliko in velikostjo listov in cvetov, številom cvetov in spremenjenim časom cvetenja (Rout in sod., 2006). Cilj novejših biotehnoloških metod je poleg ohranjanja genskega nabora določene vrste, tudi povečanje variabilnosti z eksogenimi dejavniki in ustvarjenje novih genotipov (Rugini in sod., 2006).

Adventivna regeneracija pri oljki je bila do sedaj dosežena le pri nekaterih sortah. O uspešni adventivni regeneraciji sta poročala Mencuccini and Rugini (1993). V svoji študiji sta preizkušala odzivnost sort 'Canino', 'Moraiolo', 'Dolce Agogia' in 'Halkidiks'. Kot izhodiščni material sta uporabila listne peclje in izsečke listov rastlin omenjenih sort, ki so rastle v rastlinjaku, na polju in pa v *in vitro* kulturi. V obsežni raziskavi poročata o uspehu adventivne regeneracije le pri sortah, ki so rastle *in vitro*, saj pri drugih sortah, ki so rastle na polju ali v rastlinjaku, pridobitev kalusa sploh ni bila mogoča. Uspešnost pridobitve adventivnih poganjkov pogojujeta z uspešno vzpostavitev *in vitro* kulture željene sorte, ki pa pri nekaterih sortah oljk še danes ni mogoča. Predvidevata da je uspešna pridobitev adventivnih poganjkov odvisna od izhodiščnega tkiva, kjer so se listni peclji izkazali za najbolj primerne, saj so pri teh dobili vsaj en adventivni poganjek. Poročata tudi o težavah pri regeneraciji iz kalusa, ki se je pokazala kot sortno specifična in je bila najbolj uspešna pri sorti 'Moraiolo', s konstantnim prestavljanjem kalusa na gojišča z različno vsebnostjo avksinov in citokininov.

Kot je razvidno iz literature je izbor izhodiščne sorte in pa primernih tkiv za uspešno adventivno regeneracijo ključnega pomena. V našem poskusu adventivne regeneracije sorte 'Canino' nismo bili uspešni. Kljub preizkušanjem različnih gojišč in koncentracij rastnih hormonov nismo pridobili nobenega adventivnega poganjka, saj se je v vseh primerih razvil le manjši kalus oziroma nekaj organogenih struktur.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

V Sloveniji je posajenih 1831 ha oljčnikov (vir: Evidenca dejanske rabe kmetijskih in gozdnih zemljišč na dan 22.2.2013). Ocenjuje se, da je dodatnih, potencialnih površin, zlasti zemljišča v zaraščanju, za skoraj 1000 ha. V povprečju so oljčniki majhni (0,3 ha) in razdrobljeni, le 4 % oljčnikov je velikih nad 1 ha. Do pospešenega razvoja oljkarstva je prišlo po pozebi v letu 1985, s pomočjo finančne podpore občin in države. Trend naraščanja oljčnih dreves je prisoten od leta 1988, hkrati je prisoten trend prehoda iz ekstenzivne v intenzivnejše gojenje oljk. Obnove oljčnikov so naraščale do leta 1996, ko je bila obnova najvišja, približno 60 ha letno, v zadnjih letih pa je letno vzpostavljenih okoli 20 ha novih oljčnih nasadov. Del konvencionalne pridelave se je spreobrnil v okolju prijaznejši način pridelave. V letu 2011 je bila integrirana pridelava na 187 ha, ekološka pa na 93 ha oljčnikov. Velik napredek je zaznati v kakovosti oljčnega olja, saj med analiziranim oljčnim oljem, približno 90 % dosega najvišji standard ekstra deviško oljčno olje, razvijati pa se je začelo tudi področje pridelave namiznih oljk.

Slovenska pridelava oljčnega olja je v primerjavi z EU državami pridelovalkami oljčnega olja po količini sicer zanemarljiva, vendar pa oljčno olje dosega visoko kakovost. Vodilne svetovne proizvajalke oljčnega olja so sredozemske države EU, in sicer Italija, Grčija, Španija in Portugalska, ki proizvedejo kar 80 % celotne svetovne proizvodnje oljčnega olja. Vendar je pri njih v zadnjih letih že zaznati kopičenje zalog in zaradi tega padec cen oljčnega olja. Izvoz slovenskega oljčnega olja je zanemarljiv, uvoz pa dosega do 1600 ton.

Sorta 'Istrska belica' je zaradi številnih dobrih lastnosti kot so visoka oljevitost, dobra in redna rodnost, visoka kakovost in specifičnost oljčnega olja, najbolj zastopana sorta v slovenski Istri.

Primarni namen žlahtnjenja oljk je v današnjem času predvsem premagovanje omejujočih dejavnikov. Pri oljki želimo premostiti omejujoče dejavnike, kar bi lahko dosegli s skrajšanjem neproduktivne faze (juvenilna faza), povečanjem števila in velikosti plodov, povečanjem oljevitosti ter kakovosti olja (sestava maščobnih kislin, vsebnost biofenolov, vitaminov itd.), z omejitvijo izmenljive rodnosti, spremembe strukture krošnje drevesa, izboljšanjem odpornosti na škodljivce (predvsem na oljčno muho) ter nekatere bolezni (Pavje oko). Drugi pomembni nameni žlahtnjenja pa so zagotovo tudi izboljšanje tolerance na mraz, ki bi zagotovila pridelavo oljk tudi v hladnejših območjih, in pa spodbujanje samorodnosti, s čimer se lahko izognemo odvisnosti od tujih oprašiteljev.

Namen doktorske disertacije je bil preizkusiti in uporabiti različne novejši biotehnološke pristope za žlahtnjenje oljke sorte 'Canino' in 'Istrska belica'. Kot novejši biotehnološke tehnike smo preizkusili obsevanje rastlin *in vitro* z X-žarki, ter ovrednotenje mutacij z molekulskimi markerji. Sočasno smo želeli pridobiti tkivno kulturo naše udomačene sorte Istrske belice, na testni rastlini pa smo preizkusili novejšo metodo transformacije z dostavnimi peptidi, ter s postopkom za adventivno regeneracijo preizkušali odzivnost tkiv in uporabo primerne gojišča.

In vitro vzgoja omogoča nove možnosti žlahtnjenja in klonskega razmnoževanja, ki nadgrajujejo standardne žlahtniteljske postopke. Uvedba mikropropagacije omogoča hitro klonsko razmnoževanje in možnost izboljšave zdravstvenega statusa sadik. Po nekaj letih preizkušanja različnih gojišč nam je uspelo pridobiti tkivno kulturo, ki jo uspešno razmnožujemo z mikropropagacijo. Omenjeno neodzivnost smo premostili z uporabo gojišča DKW in dodatkom zeatin ribozida (4 mg/l) v fazi iniciacije tkivne kulture. Po uspešni iniciaciji smo uporabili gojišče OM, z dodatkom zeatin ribozida (4,8 mg/l) in giberelinske kisline (1,49 mg/l). Kot pomemben korak pri vzpostavitvi tkivne kulture se je izkazalo tudi namakanje izsečkov v mešanici antioksidantov, ki so preprečili prezgodnjo porjavitev in propad izsečkov. Z vzpostavitvijo tkivne kulture smo uspešno pridobili akseničen rastlinski material in bo njegova uporabnost za namen žlahtnjenja oljk izrednega pomena.

Pri obsevanju *in vitro* rastlin smo uporabili sorto 'Canino'. Vzporedno smo za namen ocenjevanja spremenjenih morfoloških znakov uporabili sevanje z uporabo kovinskega filtra (aluminijaste folije) in pa sevanje brez tovrstnih filtrov. Uporabili smo tri različne doze sevanja in sicer 10, 30 in 60 Gy. Izkazalo se je, da rastline, s prejeto dozo 60 Gy niso preživele aklimatizacije, oziroma so v primeru obsevanja brez uporabe aluminijastega filtra takoj propadle. Pri obsevanju s filtrom in sevalno dozo 10 Gy, smo pri ocenjevanju morfoloških znakov zaznali rahlo povečan odstotek koreninjenja, teža poganjkov pa se je v primeru obsevanja s filtrom pri najvišji dozi zmanjšala za 36 %. Izsečki, obsevani brez aluminijastega filtra pa najvišje doze sevanja niso preživel. Po meritvi velikosti jedra s pretočno citometrijo večjih razlik v velikosti genoma nismo zaznali, se je pa pokazalo rahlo zmanjšanje velikosti genoma pri obsevanih rastlinah s 30 Gy. Metoda merjenja velikosti genoma s pretočno citometrijo, se je za takšen namen izkazala kot uporabna, saj bi večje delecije v genomu lahko negativno vplivale na razvoj rastlin. V nadaljnjih raziskavah, smo z uporabo molekulskih markerjev pri rastlinah, obsevanih s sevalno dozo 10 Gy, zaznali velik delež mutacij, ki pa na morfoloških znakih zaenkrat niso bile opazne. Prav zaradi tega je pomembno, da se pri nadaljnjem spremljanju rasti obsevanih rastlin posebno pozornost nameni tudi rastlinam ki so prejele nizke doze sevanja.

Za detekcijo mutacij, ki so nastale z obsevanjem rastlin smo uporabili dva markerska sistema in sicer markerje AFLP in pa mikrosatelite. Pri analizi z markerji AFLP smo z uporabo 13-ih kombinacij začetnih oligonukleotidov uspešno namnožili 630 fragmentov, odsto-

tek polimorfizma pa je znašal 28,4 %. Polimorfizem se je odražal kot odsotnost ali pojav novega fragmenta v primerjavi s kontrolno rastlino. Največ novonastali fragmentov smo zaznali pri obsevanju s 30 Gy, medtem ko je pri obsevanju s sevalno dozo 10 Gy, naraslo število odsotnih fragmentov. Tehnika z markerji AFLP se je pri oljki izkazala kot občutljiva in primerna metoda za zaznavanje mutacij.

Pri analizi DNA obsevanih rastlin z mikrosatelitskimi markerji v alelnih profilih uporabljenih lokusov razlik nismo zaznali. Sklepamo, da v našem primeru mutacij z mikrosatelitskimi markerji nismo zaznali zaradi akutne, katkotrajne izpostavljenosti sevanju, ki se od kronične, konstante izpostavljenosti močno razlikuje, kar navajajo tudi nekateri avtorji (Vornam in sod., 2004). Iz tega lahko sklepamo, da mikrosatelitski markerji, ki so v splošnem zelo uporabni za različne genetske študije, niso najbolj primeren sistem za odkrivanje mutacij pri akutno obsevanih rastlinah oljk.

Pri preizkušanju novejših metode transformacije z dostavnimi peptidi smo kot testno rastlino uporabili rastline tobaka. Tekom raziskav smo ugotovili, da je čas za vezavo kompleksa, dostavnega peptida in pa tarčnega gena, bistvenega pomena. s preizkušanjem različnih časovnih intervalov smo uspešno izvedli transformacijo mikrospor tobaka. S tem smo dokazali, da je transformacija mikrospor s celičnimi dostavnimi peptidi mogoča in je lahko v prihodnosti, ob sočasni, uspešni regeneraciji mikrospor oljk lahko ena od perspektivnih metod žlahtnjenja.

Adventivna regeneracija pri oljki je bila dosežena le v posameznih primerih, saj se je izkazala za zelo težavno in sortno specifično. Kot je razvidno iz literature je izbor izhodiščne sorte in pa primernih tkiv za uspešno adventivno regeneracijo ključnega pomena. V našem poskusu adventivne regeneracije sorte 'Canino' nismo bili uspešni. Kljub preizkušanjem različnih gojišč in koncentracij rastnih hormonov nismo pridobili nobenega adventivnega poganjka, saj se je v vseh primerih razvil le manjši kalus in nekaj organogenih struktur.

6.2 SUMMARY

In Slovenia, approximately 1831 ha of fertile land were planted with olives in 2013. Estimates show that an additional 1000 ha of abandoned land represent potential additional growing areas. In groves, young trees are prevalent, primarily because many of the groves have been renewed in the past twenty years.

The olive tree reaches full fertility in 8 to 12 years. Older trees are much more resistant to various environmental stress factors, e.g. drought and frosts, and give more reliable crops. In Slovenia, olive groves are planted on demanding terrain, mainly on terraces and exposed

positions not allowing effective irrigation, which represent land unsuitable for cultivation of other crops. An estimated 2,500 olive growers reside in Slovenia.

Frost damage in 1985 led to financial support to municipalities by the State, which led to a marked increase in both scale and technological intensity of olive cultivation. Since 1988, olive production is steadily increasing, and currently a transition from extensive to more intensive cultivation is evident, with an increasing number of growers committing to environmentally friendly cultivation practices. In 2011, estimates of integrated production and organic production totalled 187 ha and 93 ha, respectively.

The variety 'Istrska belica' is the most common variety in Slovene Istria due to a number of desirable characteristics, including high oil content, high and steady yield, and good quality and specific character of its olive oil.

The primary modern olive tree breeding objectives are aimed at overcoming various factors that have a negative effect on oil yield. These objectives may be achieved by shortening the non-productive phase (juvenile stage) of the cultivars, increasing the number and size of the fruit, controlling biennial cropping, optimizing canopy structure, and enhancing resistance to pests (especially to olive fruit fly) and diseases (especially peacock spot). Additional notable breeding objectives include increasing cold hardiness, which would allow effective olive production in areas with colder climates, and introduction of stable self-fertility, which would bypass the need for planting genetically distant cultivars solely as pollinators.

The aim of the doctoral dissertation was to test and apply modern biotechnological approaches geared towards breeding the olive varieties 'Canino' and 'Istrska belica'. The tested modern biotechnological approaches were *in vitro* irradiation with X-rays and characterization of mutations through use of molecular markers. In addition, we wanted to obtain a tissue culture of the local domesticated variety 'Istrska belica'. Finally, we tested a cutting-edge transformation protocol involving the use of cell-penetrating peptides on tobacco by exploring adventitious regeneration rates of various explants on different media.

In vitro tissue culture techniques enable novel possibilities for breeding and clonal propagation, superior to standard clone propagation methods. The introduction of micropropagation techniques enables rapid clonal propagation, as well as a means of promoting the health status of seedlings. After a few years of testing different media, we were able to establish a tissue culture, which we were able to preserve through subcultivation.

The non-responsive stage in the variety was overcome through the use of DKW and the addition of zeatin riboside to the medium (4 mg/l) at the initiatory stage. Following successful initiation, the explants were transferred to OM medium, with the addition of zeatin

riboside (4.8 mg/l) and gibberellic acid (1.49 mg/l). Treating nodes with a mixture of antioxidants, which prevents premature browning and collapse of the nodes, was identified as a crucial step in the establishment of tissue culture. Through the establishment of tissue culture, we have successfully acquired axenic plant material, which is of tremendous value for the breeding programme of olive trees.

Breeding of traditional olive cultivars often requires an increase in variability, which can be achieved by induction of mutations, often through X-ray irradiation. We investigated the effects of X-ray irradiation at 0, 10, 30 and 60 Gy delivered to *in vitro* grown shoots of the olive variety 'Canino'. Dose increase affected all measured parameters. The highest doses caused a shoot weight loss of 36% (aluminum shielding) or completely stunted growth (without shielding); similarly, the average shoot height was decreased at increasing doses. Rooting ability induced after a month of subculturing treated shoots was also affected. Surprisingly, a 10 Gy dose did not induce decreased growth in most cases, and frequently resulted in a slight growth increase in both treatments, while a 30 Gy dose significantly diminished rooting ability. At 60 Gy, shoots were either heavily damaged (aluminum shielding) or growth was completely inhibited (without shielding).

Nuclear DNA content measured in greenhouse grown plants was variable. The determined nuclear DNA content of control, 10 and 30 Gy treated plants was 2.972, 2.963 and 2.935 pg/2C nucleus, respectively, and in effect was decreasing by irradiation dose. The nuclear DNA content of genotypes irradiated at 30 Gy was significantly lower than at 10 Gy. Shoots treated with 60 Gy were not measured since none of them passed the acclimatization stage.

SSR profiling of all tested samples, derived either from treated (10 and 30 Gy) or non-treated controls showed no variation. Heterozygosity was found at all six loci but no variation in SSR profiles was found between non-treated and treated samples. The finding that no mutation events could be detected by SSR profiling of irradiated shoots suggests that this otherwise widely accepted marker system is not particularly suitable for the detection of irradiation induced polymorphism. In fact, we could find only a few cases in which induced mutation events could be detected using SSR markers.

AFLP analysis using 13 primer combinations allowed amplification of a considerable number of polymorphic loci. The total number of bands ranged between 3 and 159. Altogether, 630 scorable fragments were amplified, among which 179 (28.4%) were polymorphic (Table 5). Polymorphism was expressed both as the appearance of additional fragments and by the absence of fragments compared to non-treated control. An example of new or absent fragments is shown in Fig. 1. The polymorphism frequency varied from 6.3 % to 91.7 % per primer combination. Primer combinations *Pst*-aca/*Mse*-cac and *Pst*-aac/*Mse*-ag produced large numbers of amplified fragments but a relatively low number of

polymorphic fragments, while primer combinations *Eco-aac/Mse-cga* and *Pst-aga/Mse-ctt* produced a lower number of amplified fragments, which were highly polymorphic. The relationship between the formation of additional fragments and the occurrence of absent bands was compared between plants irradiated by 10 and 30 Gy dose (Fig. 2). Plants irradiated with 10 Gy showed a higher number of absent fragments, while the presence of additional fragments prevailed in plants irradiated with 30 Gy. At a 10 Gy dose, primer combinations *Eco-aac/Mse-cga*, *Pst-aca/Mse-cac* and *Eco-acg/Mse-ctc* produced the highest number of absent fragments, while at a 30 Gy dose, *Pst-aca/Mse-cac*, *Eco-acc/Mse-ctg* and *Pst-aga/Mse-ctt* produced the highest number of additional fragments. Most abundant were additional fragments for P-aac-M-cat-158 and P-aca-Mcaa-104, which were observed in 13 (72.2%) and 8 (44.4%) out of 23 treated samples, respectively.

Our finding that larger numbers of both absent and novel fragments were found at a 10 Gy dose than at a 30 Gy dose (225 and 165, respectively) might be caused by the nature of mutations at the two doses. Smaller doses could be expected to induce minor genetic changes at a nucleotide level, which affect target sites of restriction enzymes, so both observed events (absent and novel fragments) could be expected at increased frequencies. On the other hand, higher doses can also induce more severe DNA damage, including small deletions, which might cause a significant degree of elimination of restriction enzyme target sites. This assumption is supported by the observed decreased nuclear DNA content at a 30 Gy dose. Similarly, the presence or absence of amplified fragments observed in irradiated plant AFLP profiles has been reported in several other species.

Our findings suggest that AFLP markers represent a highly sensitive tool for identification of mutation events in olives. Since no negative effects were observed on morphological parameters with 10 Gy treatments, while substantial variation at the same dose was observed by marker analysis, we suggest that morphological observations of olive mutant trees should focus on mutants irradiated with low irradiation doses.

Our results also suggest that X-ray irradiation of *in vitro* grown shoots provides an efficient system that generates a sufficient number of induced mutations and that mutation events can be effectively scored by measurement of nuclear DNA content and by AFLP profiling.

As a final endeavor, we tested a novel transformation protocol implementing a cell--penetrating peptide (CPP) delivery system on the model species tobacco. We noticed that the duration of the binding of the CPP-target gene complex was essential for efficient transformation. By testing various time intervals, we have achieved successful transformation of tobacco microspores, and thereby established that transformation of microspores with CPPs may represent a viable approach towards olive tree breeding.

Adventitious regeneration was achieved in just a few cases and was found to be difficult and variety-dependent. As is evident from the literature, selection of both variety and suitable starter tissue is crucial for successful regeneration. Our attempt to achieve adventitious regeneration of cultivar 'Canino' was unsuccessful. Despite testing different media and concentrations of various growth hormones, adventitious regeneration was unsuccessful, probably due to the fact that only a small callus formation was observed.

7 VIRI

- Adamič F. 1982. Oljka v slovenski Istri: raziskave in strokovne osnove za modernizacijo pridelovanja oljk in oljčnega olja. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 127 str.
- Adler I. 1973. Fizika. Ljubljana, DZS: 157 str.
- Agarwal M., Shrivastava N., Padh H. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*, 27: 617–631
- Ahloowalia B.S., M. Maluszynski. 2001. Induced mutations - A new paradigm in plant breeding. *Euphytica*, 118: 167–173
- Arunyanart S., Soontronyatara S. 2002. Mutation induction by gamma and X-ray irradiation in tissue cultured lotus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 70: 119-122
- Atienzar F.A., Venier P., Jha AN., Depledge M.H. 2002. Evaluation of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for the detection of DNA damage and mutations. *Mutation Research -Genetic Toxicology*, 521: 151–163
- Baldoni L., Nicolo G., Cultrera RM., Ricciolini C., Arcioni S., Vendramin GG., Buonamici A., Porceddu A., Sarri V., Ojeda MA., Trujillo I., Rallo L., Belaj A., Perri E., Salimonti A., Muzzalupo I., Casagranse A., Lain O., Messina R., Testolin R. 2009. A consensus list of microsatellite markers for olive genotyping. *Molecular Breeding*, 24: 213-231
- Bandelj D., Jakše J., Javornik B. 2002. DNA fingerprinting of olive varieties by microsatellite markers. *Food Technology and Biotechnology*, 40: 185–190
- Bandelj D., Jakše J., Javornik B. 2004. Assessment of genetic variability of olive varieties by microsatellite and AFLP markers. *Euphytica*, 136: 93–102
- Bandelj Mavsar D. 2005. Analiza genetske variabilnosti oljke (*Olea europaea* L.) z molekulskimi markerji. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 116 str.
- Bartolini G., Leva A.R., Benelli A. 1990. Advances in *in vitro* culture of the olive: Propagation of cv. Maurino. *Acta Horticulturae*, 286: 41-44
- Belaj A., Caballero, J.M., Barranco D. 2003. Genetic characterization and identification of new accessions from Syria in an olive germplasm bank by means of RAPD markers. *Euphytica*, 134: 261-268

- Belaj A., Satovic Z., Rallo L., Trujillo I. 2004. Optimal use of RAPD markers for varietal identification in olive (*Olea europaea* L.) germplasm collections. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129, 2: 266-270
- Benitez Y., Botella MA., Trapero A., Alsalimiya M., Caballero JL., Dorado G., Munoz-Blanco J. 2005. Molecular analysis of the interaction between *Olea europaea* and the biotrophic fungus *Spilocaea oleagina*. *Molecular Plant Pathology*, 6: 425–438
- Besnard G., Khadari B., Baradat P., Bervillé A. 2002. Combination of chloroplast and mitochondrial DNA polymorphisms to study cytoplasmic genetic differentiation in the olive complex (*Olea europaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 105: 139-144
- Bracci T., Sebastiani L., Busconi M., Fogher C., Belaj A., Trujillo I. 2009. SSR markers reveal the uniqueness of olive cultivars from the Italian region of Liguria. *Scientia Horticulturae*, 122: 209-215
- Breton C., Tersac M., Berville A. 2006. Genetic diversity and gene flow between the wild olive (oleaster, *Olea europaea* L.) and the olive: several Plio-Pleistocene refuge zones in the Mediterranean basin suggested by simple sequence repeats analysis. *Journal Biogeography*, 33: 1916-1928
- Briccoli-Bati C., Fodale A., Mule R., Trombino T. 1999. Trials to increase in vitro rooting of *Olea europaea* L. cuttings. *Acta Horticulturae*, 474: 91–94
- Bruno L., Chiappetta A., Muzzalupo I., Gagliardi C., Laria D., Bruno A., Greco M., Gianino D., Perri E., Bitonti MB. 2009. Role of geranylgeranyl reductase gene in organ development and stress response in olive (*Olea europaea*) plants. *Functional Plant Biology*, 36: 370–381
- Butinar B., Bučar-Miklavčič M., Čalijski D. 1999. Phenolic compounds in selected olive oils from Slovenian Istra. V: *Proceedings of the Euro Food Chem X. Functional foods – a new challenge for the food chemists*, Budapest, Hungary, 22-24 september, 1999. László R. (ed.). Federation of European Chemical Societies, Food Chemistry Division, Hungarian Scientific Society for Food Industry, Technical University of Budapest, Hungarian Chemistry Society: 506
- Carriero F., Fontanazza G., Cellini F., Giorio G. 2002. Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 301-307
- Chang M., Chou J.C., Chen C.P., Liu B.R., Lee H.J. 2007. Noncovalent protein transduction in plant cells by macropinocytosis. *New Phytology*, 174: 46-56

- Chang M., Chou J.C., Lee H.J. 2005. Cellular internalization of fluorescent proteins via Arginine- rich intracellular delivery peptide in plant cells. *Plant Cell Physiology*, 46:482-88
- Chugh A., Eudes F. 2008. Cellular uptake of cell-penetrating peptides, pVEC and transpor-tan in plants. *Journal of Peptide Science*, 14, 4: 477-481
- Chugh A., Eudes F. 2007. Translocation and nuclear accumulation of monomer and dimer of HIV-1Tat basic domain in triticales mesophyll protoplasts. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768: 419-426
- Chobba IB., Elleuch A., Ayadi I., Khannous L., Namsi A., Cerqueira F., Drira N., Gharsallah N., Vallaeys T. 2013. Fungal diversity in adult date palm (*Phoenix dactylifera* L.) revealed by culture-dependent and culture-independent approaches. *Biomedicine and Biotechnology*, 14: 1084-1099
- Cipriani G., Marrazzo M.T., Marconi R., Cimato A., Testolin R. 2002. Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 223-228
- Colao M.C., Colli F., Cammilli C., Gutierrez-Pesce P., Cristofori V., Rugini E. in Muleo R. 2011. Assessment of olive variability in Latium (Central Italy) through SNPs, SSRs and Morphological Traits. *Acta Horticulturae*, 918: 253-260
- Cordeiro A.I., Sanchez-Sevilla J.F., Alvarez-Tinaut M.C. , Gomez-Jimenez M.C. 2008. Genetic diversity assessment in Portugal accessions of *Olea europaea* by RAPD markers. *Biologia Plantarum*, 52: 642-647
- D'Angeli S., Altamura M.M. 2007. Osmotin induces cold protection in olive trees by affecting programmed cell death and cytoskeleton organization. *Planta*, 225:1147–1163
- De la Rosa R., Angiolillo A., Guerrero C., Pellegrini M., Rallo L., Besnard G., Berville A., Martin A. , Baldoni L. 2003. A first linkage map of olive (*Olea europaea* L.) cultivars using RAPD, AFLP, RFLP and SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 1273-1282
- Dimassi-Theriou K. 1994. In vitro propagation of cv. Kalamon olives (*Olea europaea sativa* L.). *Advances in Hortscience*, 8: 185–189
- Doležel J. 1991. Flow Cytometric Analysis of Nuclear-DNA Content in Higher-Plants. *Phytochemical Analysis*, 2: 143–154

- Doležel J., Binarova P. And Lucretti S. 1989. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biologia Plantarum*, 31: 113-120
- Donini B., Roselli G. 1972. Mutation induced in the olive by irradiation of rooted cuttings. *Genet Engineering in Agronomy*, 26: 149–160
- Donini B., Mannino P. in Roselli G. 1982. A compact mutant variety of olive induced by mutation. *Mutation Breeding Newsletter*, 19: 3
- Driver J. A., Kuniyuki, A.H. 1981: In vitro propagation of Paradox walnut rootstock. *Horticulture Science*, 19: 507-509
- Ercisli S., Barut E. , Ipek A. 2009. Molecular characterization of olive cultivars using amplified fragment length polymorphism markers. *Genetics and Molecular Research*, 8: 414-419
- Essadki M., Ouazzani O., Lumaret R. , Moumni M. 2006. ISSR variation in olive-tree cultivars from Morocco and other western countries of the Mediterranean Basin. *Genetic Resource and Crop Evolution*, 3: 475–482
- Eudes F., Chugh A. 2008. Cell-penetrating peptides. From mammalian to plant cells. *Plant Signaling and Behavior*, 3, 8: 549-550
- Fiorino P., Leva A.R. 1986. Investigations on the micropropagation of the olive (*Olea europaea* L.). Influence of some mineral elements on the proliferation and rooting of explants. *Olea*, 17: 101–104
- García-Férriz L., Ghorbel R., Ybarra M., Marì A., Belaj A., Trujillo I. 2002. Micropropagation from adult olive trees. *Acta Horticulturae*, 586: 879–882
- Gemas V.J.V., Almadanim M.C., Tenreiro R., Martins A. , Fevereço P. 2004. Genetic diversity in the Olive tree (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) cultivated in Portugal revealed by RAPD and ISSR markers. *Genetic Resource and Crop Evolution*, 5: 501-511
- Gesteira A.S., Otoni W. C., Barros E. G. and Moreira M. A. 2002. RAPD-based detection of genomic instability in soybean plants derived from somatic embryogenesis. *Plant Breeding*, 121: 269–271
- Gismondi A., Canini A. 2013. Microsatellite analysis of Latial *Olea europaea* L. Cultivars. *Plant Biosystems*, 147, 3: 686-691

- Godec B., Hudina M., Usenik V., Fajt N., Koron D., Solar A., Vesel V., Ambrožič Turk B., Vrhovnik I., Kodrič I. 2011. Sadni izbor za Slovenijo 2010. Ljubljana, Orbis: 73 str.
- Gomes S., Martins-Lopes P., Guedes-Pinto H. 2012. Olive tree genetic resources characterization through molecular markers. V: Genetic diversity in plants. Caliskan M. (Ed.), Zagreb, InTech: 15-28
- Gomes S., Martins-Lopes P., Lopes L., Guedes-Pinto H. 2009. Assessing genetic diversity in *Olea europaea* L. using ISSR and SSR markers. Plant Molecular Biology Reports, 123: 82-89
- Grati-Kamoun N., Mahmoud F., Rebaï A., Gargouri A., Panaud O., Saar A. 2006. Genetic diversity of Tunisian olive tree (*Olea europaea* L.) cultivars assessed by AFLP markers. Genetic Resource and Crop Evolution, 53: 265-275
- Grigoriadou K., Vasilakakis M., Eleftheriou E.P. 2002. *In vitro* propagation of the Greek olive cultivar 'Chondrolia Chalkidikis'. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 71: 47-54
- Guerin J., Mekurra G., Collins G., Jones G., Burr M., Wirtensohn M., Sedgley M. 2002. Olive cultivar improvement through selection and biotechnology. Advances in Horticultural Science, 16: 198-203
- Gustafsson A. 1941. Mutation experiments in barley. Hereditas, 27: 225-242
- Hashmi G., Huettel R., Meyer R., Krusberg L. and Hammerschlag F. 1997. RAPD analysis of somaclonal variants derived from embryo callus cultures of peach. Plant Cell Reports, 16: 624-627
- Hugues C. 1999. Maslinarstvo Istre/Elaiografia Istriana. Miljković I. (ur.). Zagreb, Ceres: 284 str.
- Johnson E.L. 1928. Tuberization of potatoes increased by x-rays. Science, 68 (1758): 231
- Khadari B., Breton C., Moutier N., Roger J.P., Besnard G., Bervillé A., Dosba, F. 2003. The use of molecular markers for germplasm management in a French olive collection. Theoretical and Applied Genetics, 106: 521-529
- Koprivnjak O., Pribetić Đ. 2000. Cultivar autoctone di olivo in Istria - risultati preliminari delle caratteristiche morfologiche e qualità dell' olio. V: Proceedings of the Confe-

- rence »Perspectives for horticulture and viticulture in the alpine region in the third millenium«, Udine, 8-10 nov: 216-220
- Kovalchuk O., Dubrova Y.E., Arkhipov A., Hohn B., Kovalchuk I. 2000. Germline DNA – wheat mutation rate after Chernobyl. *Nature*, 407: 583–584
- Kuchma O., Vornam B., Finkeldey R. 2011. Mutation rates in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) from Chernobyl exclusion zone evaluated with amplified fragment-length polymorphisms (AFLPs) and microsatellite markers. *Mutation Research*, 725: 29-35
- Kump B. and Javornik B. 1996. Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) populations by RAPD markers. *Plant Science*, 114: 149–158
- Lambardi M., Benelli C., Amorosi S., Branca C., Caricato G., Rugini E. 1999. Microprojectile-DNA delivery in somatic embryos of olive (*Olea europaea* L.). *Acta Horticulturae*, 474:505–509
- Leva A.R., Petruccelli R., Goretti R., Panicucci M. 1992. Ruolo di alcuni microelementi e carboidrati nella proliferazione 'in vitro' di cv. di olivo (*Olea europaea* L.). V: Atti Conv. "Olive oil quality" Firenze: 333–334
- Lopes T., Capelo A., Brito G., Loureiro J. , Santos C. 2009. Genetic variability analyses of the somatic embryogenesis induction process in *Olea* spp. using nuclear microsatellites. *Trees-Structure and Function*, 23: 29-36
- Loureiro J., Rodriguez E., Costa A., Santos C. 2007. Nuclear DNA content estimations in wild olive (*Olea europaea* L. ssp *europaea* var. *syvestris* Brot.) and Portuguese cultivars of *O. europaea* using flow cytometry. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54: 21–25
- Mae M., Myrberg H., Jiang Y., Paves H., Valkna A., Langel U. 2005. Internalisation of cell-penetrating peptides into tobacco protoplasts. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1669: 101-107
- Maluszynski M. 2001. Officially released mutant varieties – the FAO/IAEA Database. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 65: 175-177
- Maluszynski M., Nichterlein K., van Zanten L. , Ahloowalia B.S. 2000. Officially released mutant varieties - the FAO/IAEA Database. *Mutation Breeding Review*, 12: 1–84

- Martins-Lopes P., Gomes S., Lima-Brito J., Lopes J. , Guedes-Pinto H. 2009. Assessment of clonal genetic variability in *Olea europaea* L. 'Cobrançosa' by molecular markers. *Scientia Horticulturae*, 123: 82-89
- Martins-Lopes P., Lima-Brito J., Gomes S., Meirinhos J., Santos L. , Guedes-Pinto H. 2007. RAPD and ISSR molecular markers in *Olea europaea* L.: Genetic variability and cultivar identification. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54: 117-128
- Mckay J. W., Goodspeed T. H. 1930. The effects of X-radiation on cotton. 1930. *Science*, 71: 644
- Mencuccini M. , Rugini E. 1993. In vitro shoot regeneration from olive cultivar tissues. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32: 283-288
- Mencuccini M. 2003. Effect of medium darkening on *in vitro* rooting capability and rooting seasonality of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 97: 129-139
- Montemurro C., Simeone R., Pasqualone A., Ferrara E. , Blanco A. 2005. Genetic relationships and cultivar identification among 112 olive accessions using AFLP and SSR markers. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 80: 105-110
- Murashige T. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiology of Plant*, 15: 473-497
- Ogrin D. 2002. Pozebe v Primorju z vidika uspevanja mediteranskih kultur. V: *Geografija in njene aplikativne možnosti: znanstveno in strokovno srečanje*. Bufon M. (ur.), Ljubljana (Dela, 18): 157-170
- Omamor IB., Asemota AO., Eke CR., Eziashi EI. 2007. Fungal contaminants of the oil palm tissue culture in Nigerian institute for oil palm research (NIFOR). *African Journal of Agricultural Research*, 2: 534-537
- Oses R., Valenzuela S., Freer J., Sanfuentes E., Rodriguez J. 2008. Fungal endophytes in xylem of healthy Chilean trees and their possible role in early wood decay. *Fungal Diversity*, 33: 77-86
- Patzak J. 2003. Assessment of somaclonal variability in hop (*Humulus lupulus* L.) in vitro meristem cultures and clones by molecular methods. *Euphytica*, 131: 343-350

- Pérez-Barranco G., Torreblanca R., Padilla I.M.G., Sanchez-Romero C., Pliego-Alfaro F., Mercado J.A. 2009. Studies on genetic trans-formation of olive (*Olea europaea* L.) somatic embryos: I.Evaluation of different aminoglycoside antibiotics for nptII selection. II. Transient transformation via particle bombardment. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 97:243–251
- Pérez-Barranco G., Mercado J.A., Pliego-Alfaro F., Sanchez-Romero C. 2007. Genetic transformation of olive somatic embryos through biolistic. *Acta Horticulturae*, 738:473–477
- Program razvoja podeželja Republike Slovenije za obdobje 2007 – 2013. 2009. Priloga 9: Opis avtohtonih in tradicionalnih sort kmetijskih rastlin.
http://www.arhiv.mkgp.gov.si/fileadmin/mkgp.gov.si/pageuploads/PRP/dec09/Priloga_9.pdf (22.11.2013)
- Program spremljanja kakovosti oljčnega olja v letu 2013. 2013. Ministrstvo za Kmetijstvo in okolje, republika Slovenija. Strokovna naloga.
http://www.mko.gov.si/fileadmin/mko.gov.si/pageuploads/podrocja/Kmetijstvo/spremljanje_kakovosti_oljcnega_olja_2013.pdf (22.11.2013)
- Rafalski J.A. , Tingey S.V. 1993. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPD, microsatellites and machines. *Trends in Genetics*, 9: 275-279
- Rallo P., Dorado G. , Martin A. 2000. Development of Simple Sequence Repeats (SSRs) in Olive tree (*Olea europaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 101: 984–989
- Rashid M., Liu R. H., Jin W., Xu Y. H., Wang F. L., Tao Y. Z., Wang J. M., Cheema A. A., Chen J.Q. and He G. 2009. Genomic diversity among Basmati rice (*Oryza sativa* L) mutants obtained through Co-60 gamma radiations using AFLP markers. *African Journal of Biotechnology*, 8: 6777–6783
- Rawashdeh I. 2003. Detecting genetic variation in mutants of olive cultivar Nabali using RAPD-PCR technique in Jordan. *Dirasat. Agronomy Science*, 30: 133-136
- Roussos P.A. and Pontikis C.A. 2002. In vitro propagation of olive (*Olea europaea* L.) cv. Koroneiki. *Plant Growth Regulation*, 37: 295–304
- Rout G.r., Mohapatra A., Jain S.M. 2006. Tissue culture of ornamental pot plant: a critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnology Advances*, 24: 531-560
- Rugini E. 1984. *In vitro* propagation of some olive cultivars. *Scientia Horticulturae*, 24: 123

- Rugini E. 1992. Involvement of polyamines in auxin and *Agrobacterium rhizogenes*-induced rooting of fruit trees *in vitro*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 117: 532–536
- Rugini E., Caricato G. 1995. Somatic embryogenesis and plant recovery from mature tissues of olive cultivars (*Olea europaea* L.) 'Canino' and 'Moraiolo'. *Plant Cell Reports*, 14: 257–260
- Rugini E., Baldoni L. 2005. *Olea europaea* Olive. V: *Biotechnology of fruit and nut crops*. Litz R.E. (ed.). Cambridge, CABI Publishing, 404–428
- Rugini E., Pesce Gutiérrez P. 2006. Genetic improvement of olive. *Pomologia croatica*, 12: 43-74
- Rugini E., Jacoboni A., Luppino M. 1993. Role of basal shoot darkening and exogenous putrescine treatments on *in vitro* rooting and on endogenous polyamine changes in difficult-to-root woody species. *Scientia Horticulturae*, 53: 63-72
- Rugini E., Pannelli G., Ceccarelli M. and Muganu, M. 1996. Isolation of triploid and tetraploid olive (*Olea europaea* L.) plants from mixoploid cv Frantoio and Leccino mutants by *in vivo* and *in vitro* selection. *Plant Breeding*, 115: 23–27
- Rugini E., Gutierrez-Pesce P., Sampinato P.L. 1999. New perspective for biotechnologies in olive breeding: morphogenesis, *in vitro* selection and gene transformation. *Acta Horticulturae*, 474: 107–110
- Rugini E., Biasi R., Muleo R. 2000. Olive (*Olea europaea* var. *sativa*) transformation. V: *Molecular biology of woody plants*. Vol. 2. Kluwer Academic Dordrecht Publication, 245–279
- Sabino G.F., Busconi M., da Câmara A., Fogher C. 2006. Development and characterization of microsatellite loci from *Olea europaea*. *Molecular Ecology Notes*, 6: 1275–1277
- Sakalidis ML., Hardy GStJ., Burgess TI. 2011. Endophytes as potential pathogens of the baobab species *Adansonia gregorii*: a focus on the Botryosphaeriaceae. *Fungal Ecology*, 1: 1-14
- Saker M. M., Adawy S. S., Mohamed A. A. and El-Etriby H. A. 2006. Monitoring of cultivar identity in tissue culture- derived date palms using RAPD and AFLP analysis. *Biologia Plantarum*, 50: 198–204
- Sancin V. 1990. Velika knjiga o oljki. Trst, Založništvo tržaškega tiska: 319 str.

- Sanei S.J., Razavi S.E. 2012. Survey of Olive Fungal disease in North of Iran. Annual Review and Research in Biology, 2: 27-36
- Sanz-Cortés F., Parfitt D.E., Romero C., Struss D., Llacer G., Badenes M.L. 2003. Intraspecific olive diversity assessed with AFLP. Plant Breeding, 122: 173–177
- Sarri V., Baldoni L., Porceddu A., Cultrera N.G.M., Contento A., Frediani M., Belaj A., Trujillo I., Cionini P.G. 2006. Microsatellite markers are powerful tools for discriminating among olive cultivars and assigning them to geographically defined populations. Genome, 49: 1606–1615
- Savelkoul P.H.M., Aarts H.J.M., De Haas J., Dijkshoorn L., Duim B., Otsen M., Rademaker J.L.W., Schouls L., Lenstra J.A. 1999. Amplified – Fragment Length Polymorphism Analysis: the State of the Art. Journal of Clinical Microbiology, 37: 3083-3091
- Schuelke M. 2000. An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. Nature Biotechnology, 18: 233-234
- Sefc K.M., Lopes M.S., Mendonça D., Rodrigues dos Santos M., Câmara Machado M.L., Câmara Machado A. 2000. Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea*) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. Molecular Ecology, 9: 1171–1173
- Strobel G.A. 2003. Endophytes as source of bioactive products. Microbes and Infection, 5: 535-544
- Suryanarayanan T.S., Murali T.S., Thirunavukkarasu N., Govinda Rajulu M.B., Venkatesan G., Sukumar R. 2011. Endophytic fungal communities in woody perennials of three tropical forest types of the Western Ghats, southern India. Biodiversity Conservation, 20: 913-928
- Therios I. 2009. Olives. Wallingford, CAB International: 357 str.
- Thomma B.P.H.J. 2003. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. Molecular Plant Pathology, 4: 225-236
- Touraev A., Fink C.S., Stoger E., Heberle-Bors E. 1995. Pollen selection: a transgenic reconstruction approach. Plant Biology, 92: 12165-12169
- Touraev A., Heberle-Bors E. 1999. Microspore embryogenesis and *in vitro* pollen maturation in Tobacco. Methods in Molecular Biology, 111: 281-291

- Trujillo I., Rallo L. , Arus P. 1995. Identifying olive cultivars by isozyme analysis. Journal of the American Society for Horticultural Science, 120: 318–324
- Vesel V. 1997. Sortni izbor. V: Oljka in oljčno olje. Dreu S. (ur.). Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 23-24
- Vesel V. 1998. Oljkarstvo v slovenski Istri. Glasnik ZRS Koper, 3: 50-60
- Vilhar B., Dermastia M., Dolenc Koce J., Greilhuber J., Temsch E.M. 2001. Plant Genome Size Measurement with DNA Image Cytometry. Annals of Botany, 87: 719-728
- Vornam B., Kuchma O., Kuchma N., Arkhipov A., Finkeldey R.. 2004. SSR markers as tools to reveal mutation events in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) from Chernobyl. European Journal of Forest Research, 123: 245–248
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Plot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acid Research, 23: 4407-4414
- Wu K.S. , Tanksley S.D. 1993. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. Molecular General Genetics, 241: 225-235
- Wu S.B., Collins G. , Sedgley M. 2004. A molecular linkage map of olive (*Olea europaea* L.) based on RAPD, microsatellite, and SCAR markers. Genome, 47: 26-35
- Wu Y., Wood M. D., Tao Y., Katagiri F. 2003. Direct delivery of bacterial avirulence proteins into resistant arabidopsis protoplasts leads to hypersensitive death. Plant Journal, 33: 131–137
- Yamaguchi H., Shimizu A., Degi K., Morishita T. 2008. Effects of dose and dose rate of gamma ray irradiation on mutation induction and nuclear DNA content in chrysanthemum. Breeding Science, 58: 331-335
- Zacchini M., De Agazio M. 2004. Micropropagation of local cultivar for germplasm preservation. Biologia Plantarum, 48: 589-592
- Zuccherelli G., Zuccherelli S. 2002. In vitro propagation of fifty olive cultivars. Acta Horticulturae, 586: 931-934

ZAHVALA

Delo posvečam svojim otrokoma, Izaku in Sari. Bodita srečna in poštena človeka.

Igor, hvala za vse kar si in še deliš z mano; za tvoje spodbudne besede in trenutke sreče!

Iz srca se zahvaljujem svojim staršema, Francu in Stanki Lesar, da sta mi omogočila lepo in radostno otroštvo ter skrbela zame in me podpirala na moji poti! Hvala!

Hvala, profesor dr. Borut Bohanec, za veliko možnosti in priložnosti spoznavanja dela v raziskovalnem svetu in vašo podporo.

Iskrena hvala VSEM, ki ste mi stali ob strani in podpirali mojo pot. Bila je lepa, in vesela sem da VAS imam ob sebi.

Hvala vsem mojim sedanjim in prejšnjim sodelavcem na Katedri za genetiko; moje delo ste obarvali v čudovite barve veselja in prijateljstva! Hvala vam!

PRILOGA A

Rezultati poravnave zaporedij z uporabo podatkovne baze BLAST in identifikacijski podatki z odstotki ujemanja pri analizi endofitskih gliv z markerji ITS

Preussia sp. 1 ICMP 18937 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|JN225886.1](#)|Length: 549Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 27 to 544[GenBank](#)[Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
946 bits(512)	0.0	516/518(99%)	0/518(0%)	Plus/Plus	
Query	1	CCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGTTGGGCTTCGGCCATTTCGAGATAACAC			60
Sbjct	27	CCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGTTGGGCTTCGGCCATTTCGAGATAACAC			86
Query	61	CCTTGCCCTTTTGTAGTACCTTTTCGTTTCCTCGGCAGGCTCGCCTGCCAACGGGGACCCT			120
Sbjct	87	CCTTGCCCTTTTGTAGTACCTTTTCGTTTCCTCGGCAGGCTCGCCTGCCAACGGGGACCCT			146
Query	121	TCAAAACGCTTTGTAATACCTGTAATTGTCTGATATAACAAGCAAAAATCAAACTTTCA			180
Sbjct	147	TCAAAACGCTTTGTAATACCTGTAATTGTCTGATATAACAAGCAAAAATCAAACTTTCA			206
Query	181	ACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGT			240
Sbjct	207	ACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGT			266
Query	241	GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTC			300
Sbjct	267	GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTC			326
Query	301	CTTAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTAAACCTTCAAGCTCAGCTTGGTGATGGGTGA			360
Sbjct	327	CTTAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTAAACCTTCAAGCTCAGCTTGGTGATGGGTGA			386
Query	361	CTGTCCTCCCCTCGCGGGGGGACTCGCCTCAAAAACATTGGCGGCCGGTACATTGGCTTC			420
Sbjct	387	CTGTCCTCCCCTCGCGGGTGGACTCGCCTCAAAAACATTGGCGGCCGGTACATTGGCTTC			446
Query	421	GAGCGCAGCAGAAACGCGGTCTCGAGCCCGGTGGATCGGCTCCCATAGCTATTCTTTT			480
Sbjct	447	GAGCGCAGCAGAAACGCGGTCTCGAGCCCGGTGGATCGGCTCCCATAGCTATTCTTTT			506
Query	481	ATTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACT			518
Sbjct	507	ATTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACT			544

Cladosporium sp. MS-2011-F14 genomic DNA containing ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, strain F14

Sequence ID: [emb|HE608784.1](#)|Length: 580Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 24 to 552[GenBank](#)[Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
	977 bits(529)	0.0	529/529(100%)	0/529(0%)	Plus/Minus	
Query	1	CCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAAGTTGACCCCGGCCCTCGGGCCGGGATGT	60			
Sbjct	552	CCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAAGTTGACCCCGGCCCTCGGGCCGGGATGT	493			
Query	61	TCACAACCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTGCCTCCGGGGCGACCCTGCCTCCGGGCGGGGG	120			
Sbjct	492	TCACAACCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTGCCTCCGGGGCGACCCTGCCTCCGGGCGGGGG	433			
Query	121	CCCCGGGTGGACATTTCAAACCTCTTGCGTAACCTTGAGTCTGAGTAAATTTAATTAATA	180			
Sbjct	432	CCCCGGGTGGACATTTCAAACCTCTTGCGTAACCTTGAGTCTGAGTAAATTTAATTAATA	373			
Query	181	AATTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAT	240			
Sbjct	372	AATTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAT	313			
Query	241	GCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC	300			
Sbjct	312	GCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC	253			
Query	301	GCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCACTCAAGCCTCGC	360			
Sbjct	252	GCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCACTCAAGCCTCGC	193			
Query	361	TTGGTATTGGGCGACGCGGTCCGCCGCGCGCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTTTCGTCC	420			
Sbjct	192	TTGGTATTGGGCGACGCGGTCCGCCGCGCGCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTTTCGTCC	133			
Query	421	CCTCAGCGTTGTGGAAACTATTTCGCTAAAGGGTGCCGCGGGAGGCCACGCCGTAAACAA	480			
Sbjct	132	CCTCAGCGTTGTGGAAACTATTTCGCTAAAGGGTGCCGCGGGAGGCCACGCCGTAAACAA	73			
Query	481	CCCCATTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCGCTGAAC	529			
Sbjct	72	CCCCATTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCGCTGAAC	24			

Cladosporium sphaerospermum isolate ANT03-415 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|JX171167.1](#)|Length: 554Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 12 to 544[GenBank](#)[Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
	985 bits(533)	0.0	533/533(100%)	0/533(0%)	Plus/Plus	
Query	1	CCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAAGTGACCCCGGCTCCGGCCGGGGATGTT	60			
Sbjct	12	CCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAAGTGACCCCGGCTCCGGCCGGGGATGTT	71			
Query	61	CATAACCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTGCCTCCGGGGCGACCTGCCTTTTCACGGGCGG	120			
Sbjct	72	CATAACCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTGCCTCCGGGGCGACCTGCCTTTTCACGGGCGG	131			
Query	121	GGGCCCGGGTGGACACATCAAACTCTTGCGTAACCTTGCAGTCTGAGTAAATTTAATT	180			
Sbjct	132	GGGCCCGGGTGGACACATCAAACTCTTGCGTAACCTTGCAGTCTGAGTAAATTTAATT	191			
Query	181	AATAAATTAATACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCG	240			
Sbjct	192	AATAAATTAATACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCG	251			
Query	241	AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACA	300			
Sbjct	252	AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACA	311			
Query	301	TTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTACCACTCAAGCC	360			
Sbjct	312	TTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTACCACTCAAGCC	371			
Query	361	TCGCTTGGTATTGGGCGACGCGGTCCGCCGCGCGCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCT	420			
Sbjct	372	TCGCTTGGTATTGGGCGACGCGGTCCGCCGCGCGCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCT	431			
Query	421	GTCCCCTCAGCGTTGTGGAACTATTGCTAAAGGGTGCCACGGGAGGCCACGCCGAAAA	480			
Sbjct	432	GTCCCCTCAGCGTTGTGGAACTATTGCTAAAGGGTGCCACGGGAGGCCACGCCGAAAA	491			
Query	481	ACAAACCCATTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCGCTGAACT	533			
Sbjct	492	ACAAACCCATTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCGCTGAACT	544			

Chaetomium sp. CGMCC 3.9449 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|JN209927.1|](#)Length: 1140Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 4 to 553[GenBank](#)[Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
	1016 bits(550)	0.0	550/550(100%)	0/550(0%)	Plus/Plus	
Query	1	CCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACAGAGTTGCAAACTCCCTAAACCATTGTGA				60
Sbjct	4	CCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACAGAGTTGCAAACTCCCTAAACCATTGTGA				63
Query	61	ACGTTACCTAAACCGTTGCTTcgggcgggcgggcccggggtttaccccccgggcgcccctg				120
Sbjct	64	ACGTTACCTAAACCGTTGCTTCGGCGGGCGGCCCGGGGTTACCCCCGGGCGCCCTG				123
Query	121	ggccccaccgcggggcgcccgccggAGGTACCAAACCTTTGATAATTTATGGCCTCTCTG				180
Sbjct	124	GGCCCCACGCGGGCGCCGCGGAGGTACCAAACCTTTGATAATTTATGGCCTCTCTG				183
Query	181	AGTCTTCTGTACTGAATAAGTCAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGA				240
Sbjct	184	AGTCTTCTGTACTGAATAAGTCAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGA				243
Query	241	TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAA				300
Sbjct	244	TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAA				303
Query	301	TCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATT				360
Sbjct	304	TCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATT				363
Query	361	TCAACCATCAAGCCCCGGCTTGTGTTGGGGACCTGCGGCTGCCGCAGGCCCTGAAAAGC				420
Sbjct	364	TCAACCATCAAGCCCCGGCTTGTGTTGGGGACCTGCGGCTGCCGCAGGCCCTGAAAAGC				423
Query	421	AGTGGCGGGCTCGCTGTCACACCGAGCGTAGTAGCATACATCTCGCTCTGGGCGTGCTGC				480
Sbjct	424	AGTGGCGGGCTCGCTGTCACACCGAGCGTAGTAGCATACATCTCGCTCTGGGCGTGCTGC				483
Query	481	GGGTTCCGGCCGTTAAACACCTTTTAACCCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAGAC				540
Sbjct	484	GGGTTCCGGCCGTTAAACACCTTTTAACCCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAGAC				543
Query	541	CCGCTGAACT 550				
Sbjct	544	CCGCTGAACT 553				

Chaetomium globosum 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|GQ906953.1|](#)Length: 802Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 10 to 560[GenBank](#)[Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
	1018 bits(551)	0.0	551/551(100%)	0/551(0%)	Plus/Plus	
Query	1	CCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACAGAGTTGCAAAACTCCCTAAACCATTGTGA				60
Sbjct	10	CCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACAGAGTTGCAAAACTCCCTAAACCATTGTGA				69
Query	61	ACGTTACCTACACCGTTGCTTcgggcgggcgccccggggtttacccccgggcgcccctg				120
Sbjct	70	ACGTTACCTACACCGTTGCTTCGGCGGGCGGCCCCGGGGTTTACCCCCGGGCGCCCTG				129
Query	121	ggccccaccgcgggcgccccgccggAGGTACCGAACTCTTGATACTTTATGGCCTCTCTG				180
Sbjct	130	GGCCCCACGCGGGCGCCGCCGGAGGTACCGAACTCTTGATACTTTATGGCCTCTCTG				189
Query	181	AGTCTTCTGTACTGAATAAGTCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGA				240
Sbjct	190	AGTCTTCTGTACTGAATAAGTCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGA				249
Query	241	TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAA				300
Sbjct	250	TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAA				309
Query	301	TCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATT				360
Sbjct	310	TCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATT				369
Query	361	TCAACCATCAAGCCCCGGGCTTGTGTTGGGGACCTGCGGCTGCCGCAGGCCCTGAAAAG				420
Sbjct	370	TCAACCATCAAGCCCCGGGCTTGTGTTGGGGACCTGCGGCTGCCGCAGGCCCTGAAAAG				429
Query	421	CAGTGGCGGGCTCGCTGTACACCGAGCGTAGTAGCATACATCTCGCTCCGGTCGTGCTG				480
Sbjct	430	CAGTGGCGGGCTCGCTGTACACCGAGCGTAGTAGCATACATCTCGCTCCGGTCGTGCTG				489
Query	481	CGGGTTCCGGCCGTAAACCACCTTTTAACCCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAGA				540
Sbjct	490	CGGGTTCCGGCCGTAAACCACCTTTTAACCCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAGA				549
Query	541	CCCGCTGAACT	551			
Sbjct	550	CCCGCTGAACT	560			

Biscogniauxia nummularia isolate BI21 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|EF155488.1|](#)Length: 656Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 40 to 633[GenBank](#)[Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
	1092 bits(591)	0.0	593/594(99%)	0/594(0%)	Plus/Plus	
Query	1		CCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTAGCGAGTTAAACAAACTCCAAACCCATGTGAA			60
Sbjct	40		CCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTAGCGAGTTAAACAAACTCCAAACCCATGTGAA			99
Query	61		CATACCTACTGTTGCCTCGGCAGGTCGTGCTGTGCGGTGGTGATACCTACCCTGGAGTAG			120
Sbjct	100		CATACCTACTGTTGCCTCGGCAGGTCGTGCTGTGCGGTGGTGATACCTACCCTGGAGTAG			159
Query	121		GAACCTACCCTGTAGAGACCTACCCTGGAGTGAGCTACCCTGCAGCACGCAACCAGGCC			180
Sbjct	160		GAACCTACCCTGTAGTGACCTACCCTGGAGTGAGCTACCCTGCAGCACGCAACCAGGCC			219
Query	181		TGCCAAAGGACCCCTAAACTCTGTTATAACGTACCTCTGAGTCAACTATACAAATAAGTT			240
Sbjct	220		TGCCAAAGGACCCCTAAACTCTGTTATAACGTACCTCTGAGTCAACTATACAAATAAGTT			279
Query	241		AAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGA			300
Sbjct	280		AAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGA			339
Query	301		TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCT			360
Sbjct	340		TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCT			399
Query	361		AATAGTATTCTGTTAGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCAAGCGCTATTTAG			420
Sbjct	400		AATAGTATTCTGTTAGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCAAGCGCTATTTAG			459
Query	421		CTTGACGTTGGGAATTTACAGCTGCTGTAATTCCTCAAATTTAGTGGCGGAGCTAGGTCA			480
Sbjct	460		CTTGACGTTGGGAATTTACAGCTGCTGTAATTCCTCAAATTTAGTGGCGGAGCTAGGTCA			519
Query	481		TGCTCTGAGCGTAGTAATTCTGTTCTCGCTCCTGAAGCTGCCCTATATCCTGCCGTAAAA			540
Sbjct	520		TGCTCTGAGCGTAGTAATTCTGTTCTCGCTCCTGAAGCTGCCCTATATCCTGCCGTAAAA			579
Query	541		CCCCTAAATTATAATCTGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACT			594
Sbjct	580		CCCCTAAATTATAATCTGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACT			633

Sistotrema brinkmannii strain ATCC 26295 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|DQ899094.1|](#)Length: 636Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 13 to 620[GenBank](#)[Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
	1116 bits(604)	0.0	607/608(99%)	1/608(0%)	Plus/Plus	
Query	1	CCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAATGAATTGAAAGGGAGTTGATGCTGGCCAGG				60
Sbjct	13	CCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAATGAATTGAAAGGGAGTTGATGCTGGCCAGG				72
Query	61	TCTCTGGCATGTGCTCGCTTCCGACAATCTTATCCATACACCTGTGCACACTGTGAGGGC				120
Sbjct	73	TCTCTGGCATGTGCTCGCTTCCGACAATCTTATCCATACACCTGTGCACACTGTGAGGGC				132
Query	121	ATGCAAGTGCCCTTATTTACTACATACACCTAATATGGAAATCGCACGTGACTTGCGTCG				180
Sbjct	133	ATGCAAGTGCCCTTATTTACTACATACACCTAATATGGAAATCGCACGTGACTTGCGTCG				192
Query	181	TATGGCGCTTAAAACTAAAAACAACCTTTTAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATG				240
Sbjct	193	TATGGCGCTTAAAACTAAAAACAACCTTTTAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATG				252
Query	241	AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATC				300
Sbjct	253	AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATC				312
Query	301	TTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCACGCCTGTTTCGAGTGTCGTGAA				360
Sbjct	313	TTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCACGCCTGTTTCGAGTGTCGTGAA				372
Query	361	ACTCTCAAGCTAGATGCTTTAGTGTCATCTACTTGGTTATTGGACTCTGCTGTCTCCTTG				420
Sbjct	373	ACTCTCAAGCTAGATGCTTTAGTGTCATCTACTTGGTTATTGGACTCTGCTGTCTCCTTG				432
Query	421	TCTGGAACGGCTGGTCTCAAATGTATTAGCTGGTCCTTGTGTGGGATTTGGTTCTACTC				480
Sbjct	433	TCTGGAACGGCTGGTCTCAAATGTATTAGCTGGTCCTTGTGTGGGATTTGGTTCTACTC				492
Query	481	AGCGTGATAAT - TATGACCGCTGAGGACATCTCTCGGGATGGCCAAGCCTGCCTTGGGCT				539
Sbjct	493	AGCGTGATAATCTATGACCGCTGAGGACATCTCTCGGGATGGCCAAGCCTGCCTTGGGCT				552
Query	540	GCTTCTAACTCATCATCATGATATTTTTCAACTTTGACCTCGAATCAGGCGGGACTACCC				599
Sbjct	553	GCTTCTAACTCATCATCATGATATTTTTCAACTTTGACCTCGAATCAGGCGGGACTACCC				612
Query	600	GCTGAACT 607				
Sbjct	613	GCTGAACT 620				

PRILOGA B

Rezultati preizkušanja različnih gojišč za vzpostavitev adventivne regeneracije pri sorti 'Canino' s podrobnimi opisi gojišč in rezultati

DATUM 24.9.2008 (datum popisa 24.11.08)	gojišče 1a	gojišče 1b	gojišče 1c	gojišče 1d	gojišče 1e	gojišče 1f	gojišče 2a	gojišče 2b	gojišče 2c	gojišče 2d	gojišče 2e	gojišče 2f
število listnih pecelij skupaj:	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
število neokuženih-preživelih listnih pecelij:	23	28	28	8	10	30	30	26	14	15	9	22
število kalusiranih listnih pecelij:	23	28	28	5	7	14*	30	26	14	3	5	5*
število poganjkov:	3	7	1	1	3	11	1	4	2	3	0	5
globularni kalus (število):	2	4	4	3	2	5	1	5	1	3	2	2
neglobularni kalus (število):	21	24	24	2	5	9	29	21	13	0	3	3
ostala opažanja (spremembe na listnih peceljih):												

DATUM 9.10.2008 (datum popisa 24.11.08)	gojišče 1a	gojišče 1b	gojišče 1c	gojišče 1d	gojišče 1e	gojišče 1f	gojišče 2a	gojišče 2b	gojišče 2c	gojišče 2d	gojišče 2e	gojišče 2f
število listnih pecelij skupaj:	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
število neokuženih-preživelih listnih pecelij:	30	30	30	30	30	20	30	30	30	30	30	30
število kalusiranih listnih pecelij:	29	29	30	3	4	7*	30	30	30	10	4	9*
število poganjkov:	1	1	4	2	4	8	1	3	6	4	3	6
globularni kalus (število):	3	4	5	3	3	4	1	4	5	3	3	4
neglobularni kalus (število):	26	25	25	0	1	3	29	26	25	7	1	5
ostala opažanja (spremembe na listnih peceljih):												

* Število organogenih struktur na kalusiranih listnih peceljih

Sestava gojišč:

1a) 20 µM TDZ (tidiazuron) in 0,1 mg/l NAA
1b) 30 µM TDZ (tidiazuron) in 0,1 mg/l NAA
1c) 40 µM TDZ (tidiazuron) in 0,1 mg/l NAA

1d) 20 µM TDZ (tidiazuron)
1e) 30 µM TDZ (tidiazuron)
1f) 40 µM TDZ (tidiazuron)

2a) 20 µM meta-topolin in 0,1 mg/l NAA
2b) 30 µM meta-topolin in 0,1 mg/l NAA
2c) 40 µM meta-topolin in 0,1 mg/l NAA

2d) 20 µM meta-topolin
2e) 30 µM meta-topolin
2f) 40 µM meta-topolin