

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Alenka BARUCA ARBEITER

**RAZVOJ IN KARAKTERIZACIJA FUNKCIJSKIH  
MARKERJEV ZA GENETSKE ŠTUDIJE OLJKE  
(*Olea europaea* L.)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Alenka BARUCA ARBEITER

**RAZVOJ IN KARAKTERIZACIJA FUNKCIJSKIH MARKERJEV ZA  
GENETSKE ŠTUDIJE OLJKE (*Olea europaea* L.)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**DEVELOPMENT AND CHARACTERISATION OF FUNCTIONAL  
MARKERS FOR GENETIC STUDIES OF OLIVE (*Olea europaea* L.)**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2017

Doktorska disertacija je zaključek interdisciplinarnega doktorskega študijskega programa Bioznanosti. Raziskava je bila v celoti opravljena na Univerzi na Primorskem, na Inštitutu za sredozemsko kmetijstvo in oljkarstvo Znanstveno raziskovalnega središča in na Fakulteti za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije v Kopru.

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu senata Biotehniške fakultete in sklepa 9. seje Komisije za doktorski študij UL z dne 23.9.2014 (po pooblastilu Senata Univerze z dne 20.1.2009) je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na doktorskem študiju Bioznanosti, znanstveno področje: biotehnologija. Za mentorico doktorske disertacije z naslovom »Razvoj in karakterizacija funkcijskih markerjev za genetske študije oljke (*Olea europaea* L.)« je bila imenovana izr. prof. dr. Dunja Bandelj.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka Javornik  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Jernej Jakše  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Jelka Šuštar Vozlič  
Kmetijski inštitut Slovenije

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Alenka BARUCA ARBEITER

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	UDK 634.63:601.4:575.822(043.3)
KG	<i>Olea europaea</i> /markerji EST-SSR/anotacija/polimorfizem/genetska raznolikost/starševski test
AV	BARUCA ARBEITER, Alenka, univ. dipl. biol.
SA	BANDELJ, Dunja (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študijski program Bioznanosti, znanstveno področje Biotehnologija
LI	2017
IN	RAZVOJ IN KARAKTERIZACIJA FUNKCIJSKIH MARKERJEV ZA GENETSKE ŠTUDIJE OLJKE ( <i>Olea europaea</i> L.)
TD	Doktorska disertacija
OP	XVI, 155, [34] str., 11 pregl., 27 sl., 5 pril., 395 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Razvili smo nov set genskih mikrosatelitskih markerjev za genetske študije oljke ( <i>Olea europaea</i> L.). Za identifikacijo mikrosatelitov smo pregledali 98.924 zaporedij EST razvijajočega plodu oljke. V 923 zaporedjih EST, ki so vsebovala mikrosatelite, smo odkrili skupno 984 mikrosatelitov, med katerimi so prevladovali dinukleotidi in sledili so jim trinukleotidi. Med dinukleotidi je prevladoval mikrosatelitski motiv GA in med trinukleotidi motiv GAA. Za izdelavo začetnih oligonukleotidov smo izbrali 110 anotiranih zaporedij EST-SSR, izmed katerih je bilo 46 polimorfnih. S sekvenčno reakcijo in poravnavo alelov EST-SSR oljke smo potrdili pomnoževanje predvidenih mikrosatelitskih motivov in odkrili visoko stopnjo ohranjenosti robnih območij analiziranih mikrosatelitskih lokusov. Sposobnost genskih markerjev SSR za odkrivanje genetske raznolikosti je primerljiva s predhodno razvitimi genomskega mikrosateliti. Povprečno število alelov na lokus je bilo 4,5, vrednosti dejanske in pričakovane heterozigotnosti ter informacijska vrednost polimorfizma pa so znašale 0,649, 0,604 in 0,539. Na podlagi rezultatov genotipizacije z markerji EST-SSR oz. SSR in na osnovi Jaccardovih koeficientov podobnosti se je jasno razlikovalo vseh 24 oljčnih sort. Genetska raznolikost znotraj sort 'Ascolana tenera' in 'Santa Caterina' se je jasno pokazala le z genomskega mikrosateliti. Za analizo starševstva smo uporabili 7 visoko polimorfnih markerjev EST-SSR. Izvedba starševskega testa s tremi različnimi računalniškimi programi (FAMOZ, CERVUS, PARENTE) je pokazala, da je 'Itrska belica' navzkrižno kompatibilna z različnimi oljčnimi sortami. Vrednosti indeksa samonekompatibilnosti med 0,2 in 1,0 so 'Itrsko belico' uvrstile med delno samonekompatibilne sorte.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd  
DC UDC 634.63:601.4:575.822(043.3)  
CX *Olea europaea*/EST-SSR markers/annotation/polymorphism/genetic diversity/paternity test  
AU BARUCA ARBEITER, Alenka  
AA BANDELJ, Dunja (supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljani, Biotechnical faculty, Interdisciplinary doctoral study program Biosciences, scientific areas Biotechnology  
PY 2017  
TI DEVELOPMENT AND CHARACTERISATION OF FUNCTIONAL MARKERS FOR GENETIC STUDIES OF OLIVE (*Olea europaea* L.)  
DT Doctoral dissertation  
NO XVI, 155, [34] p., 11 tab., 27 fig., 5 ann., 395 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB We developed a new set of functional microsatellite markers for genetic studies in olive (*Olea europaea* L.). A total of 98,924 ESTs from developing olive fruit were examined for the presence of SSRs, and 984 SSR motifs from 923 SSR containing ESTs were identified, among which dinucleotide SSRs were the most abundant, followed by trinucleotides. The motif GA was the most common among dinucleotides, while GAA was the most abundant trinucleotide SSR motif. A total of 110 EST-SSRs with annotated genes was selected for primer designing, of which 46 EST-SSRs finally showed polymorphism. The sequencing and alignment of the olive EST-SSR alleles confirmed the amplification of predicted microsatellite motifs and revealed a high degree of conservation of the SSRs flanking regions. New EST-SSRs possess genetic diversity properties comparable to previously developed genomic SSRs. The average number of alleles per locus, observed heterozygosity, expected heterozygosity, and polymorphic information content were 4.5, 0.649, 0.604 and 0.539, respectively. Cluster analysis based on EST-SSR or SSR genotyping data and Jaccard's similarity coefficient clearly distinguished 24 olive varieties, but intra-cultivar variability in 'Ascolana tenera' and 'Santa Caterina' was well resolved only by genomic SSRs. Seven new EST-SSR loci with high polymorphic information content were used for paternity analysis. Paternity testing with three computer programs (FAMOZ, CERVUS, PARENTE) showed that 'Itrska belica' is cross-compatible with other olive varieties. The index of self-incompatibility was between 0.2 and 1.0 and 'Itrska belica' variety was classified as partly self-incompatible.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	X
KAZALO PRILOG .....	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....	XIII
SLOVARČEK .....	XVI
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>4</b>
2.1 OLJKA.....	4
<b>2.1.1 Botanična klasifikacija oljke .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1.2 Razširjenost oljke v svetu .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1.3 Oljkarstvo v Sloveniji.....</b>	<b>7</b>
<b>2.1.4 Biološke značilnosti oljke.....</b>	<b>9</b>
2.1.4.1 Morfologija .....	9
2.1.4.2 Cvetenje .....	11
2.1.4.3 Biologija oprašitve in oploditve .....	13
2.1.4.4 Samonekompatibilnost in sortna kompatibilnost pri oljki.....	14
2.2 MOLEKULSKI MARKERJI ZA UPRAVLJANJE GENETSKEGA MATERIALA .....	17
<b>2.2.1 Mikrosatelitski markerji.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2.2 Zbirke izraženih nukleotidnih zaporedij (ESTs) .....</b>	<b>23</b>
<b>2.2.3 Genski mikrosatelitski markerji (EST-SSRs).....</b>	<b>25</b>
2.3 RAZISKAVE GENOMA OLJKE .....	26
<b>3 MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>30</b>
3.1 RASTLINSKI MATERIAL .....	30
<b>3.1.1 Vzorčenje oljčnih listov.....</b>	<b>30</b>

<b>3.1.2 Vzorčenje oljčnih plodov .....</b>	32
<b>3.2 IZOLACIJA DNA IN MERJENJE KONCENTRACIJE.....</b>	34
<b>    3.2.1 Izolacija DNA iz oljčnih listov .....</b>	34
<b>    3.2.2 Izolacija DNA iz oljčnih embrijev .....</b>	35
<b>    3.2.3 Merjenje koncentracije DNA .....</b>	36
<b>3.3 RAZVOJ IN KARAKTERIZACIJA MARKERJEV EST-SSR .....</b>	37
<b>    3.3.1 Identifikacija markerjev EST-SSR in razvoj začetnih oligonukleotidov ....</b>	37
<b>    3.3.2 Optimizacija pomnoževanja razvitih markerjev EST-SSR .....</b>	38
<b>3.4 POTRDITEV NOVIH MARKERJEV EST-SSR S SEKVENČNO REAKCIJO.....</b>	39
<b>    3.4.1 Pomnoževanje novih markerjev EST-SSR v reakciji PCR.....</b>	40
<b>    3.4.2 Čiščenje produktov reakcije PCR .....</b>	40
<b>    3.4.3 Sekvenčna reakcija .....</b>	41
<b>    3.4.4 Čiščenje produktov sekvenčne reakcije .....</b>	41
<b>    3.4.5 Obdelava rezultatov sekvenciranja .....</b>	42
<b>3.5 ANALIZA MIKROSATELITSKIH SEKVENC TRANSKRIPTOMA OLJKE .....</b>	43
<b>3.6 PRIMERJAVA NOVIH MARKERJEV EST-SSR Z GENOMSKIMI MIKROSATELITI OLJKE .....</b>	43
<b>    3.6.1 Pomnoževanje genomskega mikrosatelitov oljke .....</b>	43
<b>    3.6.2 Izračun parametrov za karakterizacijo novih markerjev EST-SSR in genomskega mikrosatelitov oljke .....</b>	44
<b>    3.6.3 Primerjava genskih in genomskega mikrosatelitov pri proučevanju sorodnostnih odnosov oljčnih sort in pri upravljanju kolekcij oljk.....</b>	46
<b>3.7 IZDELAVA STARŠEVSKEGA TESTA Z MARKERJI EST-SSR IN DOLOČITEV NAJPOGOSTEJŠIH OPRAŠEVALNIH SORT ‘ISTRSKE BELICE’ .....</b>	48
<b>3.8 ANALIZA VREMENSKIH RAZMER V LETIH 2012 IN 2013.....</b>	50
<b>4 REZULTATI .....</b>	52
<b>    4.1 RAZVOJ IN KARAKTERIZACIJA MARKERJEV EST-SSR .....</b>	52
<b>        4.1.1 Identifikacija markerjev EST-SSR in razvoj začetnih oligonukleotidov ....</b>	52
<b>        4.1.2 Karakterizacija novih markerjev EST-SSR.....</b>	55
<b>    4.2 POTRDITEV NOVIH MARKERJEV EST-SSR S SEKVENČNO REAKCIJO.....</b>	62

4.3 ANALIZA MIKROTELITSKIH SEKVENC TRANSKRIPTOMA OLJKE .....	68
4.4 PRIMERJAVA NOVIH MARKERJEV EST-SSR Z GENOMSKIMI MIKROTELITI OLJKE.....	72
<b>4.4.1 Primerjava parametrov variabilnosti genskih in genomskeh mikrosatelitov oljke .....</b>	<b>72</b>
<b>4.4.2 Primerjava genskih in genomskeh mikrosatelitov pri proučevanju sorodnostnih odnosov oljčnih sort in pri upravljanju kolekcij oljk.....</b>	<b>76</b>
4.5 IZDELAVA STARŠEVSKEGA TESTA Z NOVIMI MARKERJI EST-SSR IN DOLOČITEV NAJPOGOSTEJŠIH OPRAŠEVALNIH SORT ‘ISTRSKE BELICE’ .....	82
4.6 ANALIZA VREMENSKIH RAZMER V LETIH 2012 IN 2013 .....	92
<b>5 RAZPRAVA.....</b>	<b>95</b>
5.1 RAZVOJ IN KARAKTERIZACIJA MARKERJEV EST-SSR .....	95
5.2 POTRDITEV NOVIH MARKERJEV EST-SSR S SEKVENČNO REAKCIJO ....	98
5.3 ANALIZA MIKROTELITSKIH SEKVENC TRANSKRIPTOMA OLJKE ....	100
5.4 PRIMERJAVA NOVIH MARKERJEV EST-SSR Z GENOMSKIMI MIKROTELITI OLJKE.....	102
<b>5.4.1 Primerjava parametrov variabilnosti genskih in genomskeh mikrosatelitov oljke .....</b>	<b>102</b>
<b>5.4.2 Primerjava genskih in genomskeh mikrosatelitov pri proučevanju sorodnostnih odnosov in pri upravljanju kolekcij oljk .....</b>	<b>105</b>
5.5 IZDELAVA STARŠEVSKEGA TESTA Z MARKERJI EST-SSR IN DOLOČITEV NAJPOGOSTEJŠIH OPRAŠEVALNIH SORT ‘ISTRSKE BELICE’ .....	108
<b>6 SKLEPI .....</b>	<b>116</b>
<b>7 POVZETEK (SUMMARY).....</b>	<b>118</b>
7.1 POVZETEK .....	118
7.2 SUMMARY .....	122
<b>8 VIRI .....</b>	<b>127</b>
<b>ZAHVALA</b>	
<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b> Imena sort, njihove oznake, kolekcijski nasad oljk in število analiziranih oljčnih dreves .....	30
<b>Preglednica 2:</b> Odstotek identificiranih motivov EST-SSR oljke .....	53
<b>Preglednica 3:</b> Seznam na novo razvitih markerjev EST-SSR oljke .....	56
<b>Preglednica 4:</b> Analiza sekvenciranih alelov, pomnoženih z novimi markerji EST-SSR oljke. Mikrosatelitska ponovitev originalnega zaporedja EST-SSR, mikrosatelitska ponovitev sekvenciranega alela, mutacije na mestu prileganja začetnih oligonukleotidov, indel mutacije v obrobnih regijah mikrosatelita .....	62
<b>Preglednica 5:</b> Parametri genetske variabilnosti posameznih markerjev EST-SSR pri 24 oljčnih sortah. Dejanska ( $H_o$ ) in pričakovana ( $H_e$ ) heterozigotnost, število alelov (n), število efektivnih alelov ( $n_e$ ), informacijska vrednost polimorfizma (PIC), verjetnost enakosti genotipov (PI), verjetnost odstopanja od Hardy-Weinbergovega ravnovesja (P-vrednost), frekvenca ničnih alelov ( $F(null)$ ) .....	73
<b>Preglednica 6:</b> Parametri genetske variabilnosti posameznih genomskeh markerjev SSR pri 24 oljčnih sortah. Dejanska ( $H_o$ ) in pričakovana ( $H_e$ ) heterozigotnost, število alelov (n), število efektivnih alelov ( $n_e$ ), informacijska vrednost polimorfizma (PIC), verjetnost enakosti genotipov (PI), verjetnost odstopanja od Hardy-Weinbergovega ravnovesja (P-vrednost), frekvenca ničnih alelov ( $F(null)$ ) .....	76
<b>Preglednica 7:</b> Število pregledanih oljčnih plodov, število suhih oz. deformiranih embrijev, število embrijev, kjer izolacija DNA ni bila uspešna ter število embrijev z uspešno izolirano DNA .....	82
<b>Preglednica 8:</b> Parametri genetske variabilnosti sedmih markerjev EST-SSR pri embrijih oljke v Ospu in Strunjanu v letih 2012 in 2013 ter pri 24 potencilnih opaševalnih oljčnih sortah. Dejanska ( $H_o$ ) in pričakovana ( $H_e$ ) heterozigotnost, število alelov (n), število efektivnih alelov ( $n_e$ ), informacijska vrednost polimorfizma (PIC), verjetnost enakosti genotipov (PI) in verjetnost izključitve (EP).....	84

<b>Preglednica 9:</b> Rezultati starševskega testa s tremi različnimi programi: FAMOZ, CERVUS, PARENTE. Število vseh analiziranih embrijev, število in odstotek embrijev z neznanim donorjem peloda, embrijev z nedoločenim donorjem peloda in embrijev z enim določenim donorjem peloda v Ospu in Strunjanu, v letih 2012 in 2013 .....	87
<b>Preglednica 10:</b> Potencialni donorji peloda ter odstotki embrijev (%) v Ospu in Strunjanu, v letih 2012 in 2013, določeni s tremi različnimi računalniškimi programi (FAMOZ, CERVUS, PARENTE) .....	88
<b>Preglednica 11:</b> Obdobje cvetenja devetih oljčnih sort na lokaciji Strunjan v letih 2012 (svetlo siva barva) in 2013 (temno siva barva). Obdobje polnega cvetenja je označeno s črno barvo .....	91

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Taksonomska shema oljke ( <i>Olea europaea</i> L.) .....	4
<b>Slika 2:</b> Oljčna sorta ‘Itrska belica’.....	9
<b>Slika 3:</b> Socvetja oljke z odprtimi cvetovi.....	10
<b>Slika 4:</b> Prečni prerez cveta oljke, 20x povečava .....	11
<b>Slika 5:</b> Ultrastruktura pelodnega zrna oljke, 1400x povečava .....	13
<b>Slika 6:</b> Kolekcijski nasad oljk v Strunjanu, februar 2012 .....	31
<b>Slika 7:</b> Kolekcijski nasad oljk na Purissimi (Ankaran), oktober 2011.....	32
<b>Slika 8:</b> Poganjek s popolnoma razvitimi socvetji, maj 2013.....	33
<b>Slika 9:</b> Izolacija poganjkov s platnenimi oprševalnimi vrečkami, maj 2013 .....	34
<b>Slika 10:</b> Prvi korak pri izolaciji DNA iz oljčnih embrijev, januar 2013 .....	36
<b>Slika 11:</b> Pogostost posameznih dolžin mikrosatelitskih motivov pri zaporedjih EST-SSR oljke .....	52
<b>Slika 12:</b> Identifikacija in izbira ter funkcijnska analiza vseh zaporedij EST-SSR .....	55
<b>Slika 13:</b> Poravnava sekvenciranega alela mikrosatelitskega lokusa OeUP-13 sorte ‘Athena’ in ‘Oblica’ ter referenčnega zaporedja EST ‘Itrske belice’. Mikrosatelitski motiv je prikazan v sivem okvirju. Nukleotidno zaporedje para začetnih oligonukleotidov je podčrtano .....	65
<b>Slika 14:</b> Poravnava sekvenciranega alela mikrosatelitskega lokusa OeUP-34 sorte ‘Cipressino’ in referenčnega zaporedja EST ‘Itrske belice’. Mikrosatelitski motiv je prikazan v sivem okvirju. Nukleotidno zaporedje para začetnih oligonukleotidov je podčrtano .....	66
<b>Slika 15:</b> Funkcijnska analiza 247 zaporedij EST-SSR oljke z uporabo programskega paketa Blast2GO .....	69

<b>Slika 16:</b> Odstotek (%) zaporedij EST-SSR oljke, ki kodirajo encime .....	69
<b>Slika 17:</b> Funkcijkska analiza 46 markerjev EST-SSR oljke z uporabo programskega paketa Blast2GO.....	70
<b>Slika 18:</b> Odstotek markerjev EST-SSR v določeni regiji gena (nekodirajoča UTR/kodirajoča CDS) .....	71
<b>Slika 19:</b> Razlikovanje števila genotipov glede na število lokusov ESR-SSR .....	77
<b>Slika 20:</b> Razlikovanje števila genotipov glede na število lokusov SSR.....	78
<b>Slika 21:</b> Dendrogram UPGMA, izdelan na osnovi markerjev EST-SSR in izračunu Jaccardovih koeficientov podobnosti vseh identificiranih genotipov oljk .....	80
<b>Slika 22:</b> Dendrogram UPGMA, izdelan na osnovi genomskeh markerjev SSR in izračunu Jaccardovih koeficientov podobnosti vseh identificiranih genotipov oljk.....	81
<b>Slika 23:</b> Število embrijev, iz katerih je bila uspešno izolirana DNA ter število uspešno genotipiziranih embrijev .....	83
<b>Slika 24:</b> Določitev mejne vrednosti LOD iz presečišča krivulj pri programu FAMOZ....	86
<b>Slika 25:</b> Delež plodov pri odkritih (naravna opašitev) in pokritih (samooprašitev) poganjkih ter delež potrjenih samooplojenih plodov 'Itrske belice' .....	90
<b>Slika 26:</b> Vrednosti maksimalnih dnevnih temperatur (°C) v obdobju od meseca marca do konca meseca julija, glede na proučevano lokacijo v letih 2012 in 2013 .....	92
<b>Slika 27:</b> Vrednosti dnevnih količin padavin (mm) v obdobju od meseca marca do konca meseca julija, glede na proučevano lokacijo v letih 2012 in 2013 .....	93

## KAZALO PRILOG

**PRILOGA A:** Poravnavo referenčnega zaporedja EST ‘Istrske belice’ in sekvenciranih alelov pri 46 lokusih EST-SSR

**PRILOGA B:** Tabela genotipizacije z markerji EST-SSR za 24 sort oljk

**PRILOGA C:** Tabela genotipizacije z genomskimi markerji SSR za 24 sort oljk

**PRILOGA D:** Jaccardovi koeficienti podobnosti med vzorčnimi oljčnimi sortami z genskimi markerji EST-SSR

**PRILOGA E:** Jaccardovi koeficienti podobnosti med vzorčnimi oljčnimi sortami z genomskimi markerji SSR

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AFLP	polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov (ang. Amplified Fragment Length Polymorphism)
ang.	angleško
BBCH	nem. Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt, Chemische Industrie
bp	bazni par
CAPS	ang. Cleaved Amplified Polymorphic Site
CDS	kodirajoče zaporedje (ang. Coding Sequence)
CTAB	N-cetil-N, N, N-trimetilamonijev bromid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DArT	tehnologija raznolikosti mrež (ang. Diversity Array Technology)
dNTP	deoksi nukleotid trifosfat
ddNTP	dideoksi nukleotid trifosfat
EDTA	etilen-diamino-tetraocetna kislina
EFP	razdalja za učinkovito opršitev (ang. Effective pollination distance)
EP	verjetnost izključitve (ang. Exclusion Probability)
ESTs	izražena nukleotidna zaporedja (ang. Expressed Sequence Tags)
F	vodilni začetni oligonukleotid (ang. Forward primer)
F(null)	frekvenca ničnih alelov (ang. Estimated frequency of null alleles)
GO	genske ontologije (ang. Gene Ontology)
GWAS	asociacijske študije celotnih genomov (ang. Genome-Wide Association Studies)
GWS	selekcija na osnovi celotnega genoma (ang. . Genome-Wide Selection)
H <sub>e</sub>	pričakovana heterozigotnost
H <sub>o</sub>	dejanska heterozigotnost

IOC	mednarodni svet za oljkarstvo (ang. International Olive Council)
ISI	indeks samonekompatibilnosti (ang. Index of self-incompatibility)
ISSR	medmikrosatelitne regije (ang. Inter Simple Sequence Repeats)
KEGG	zbirka ročno narisanih presnovnih poti (ang. KEGG pathway)
LOD	skupni logaritem razmerja verjetij (ang. Log of the odds ratio or likelihood ratio)
MAS	selekcija s pomočjo molekulskih markerjev (ang. Marker-Assisted Selection)
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina
n	dejansko število alelov lokusa
$n_e$	število efektivnih alelov lokusa
nem.	nemško
NGS	naslednja generacija sekvenciranja (ang. Next Generation Sequencing)
OGDD	podatkovna baza genetske diverzitete oljke (ang. Olive Genetic Diversity Database)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. Polymerase Chain Reaction)
PI	verjetnost enakosti genotipov (ang. Probability of identity)
PIC	informacijska vrednost polimorfizma (ang. Polymorphic information content)
pufer TE	raztopina Tris-a in EDTA
QTL	kvantitativni lokusi (ang. Quantitative Trait Loci)
r	korelacijski koeficient
R	povratni začetni oligonukleotid (ang. Reverse primer)
RAPD	naključno pomnožena polimorfna DNA (ang. Randomly Amplified Polymorphic DNA)
RFLP	polimorfizem dolžin restriktivskih fragmentov (ang. Restriction Fragment Length Polymorphisms)
RNA-Seq	določanje zaporedja RNA (ang. RNA-Sequencing)

SCAR	pomnoženi fragmenti, določeni z nukleotidnim zaporedjem (ang. Sequence Characterized Amplified Region)
SCR	S-lokus cistein bogati proteini (ang. S-locus cysteine-rich protein)
SFP	polimorfizem posamezne lastnosti (ang. Single Feature Polymorphism)
SLG	S-lokus glikoprotein (ang. S-locus glycoprotein)
SMM	model postopnega mutiranja (ang. Stepwise Mutation Model)
SNP	polimorfizem posameznih nukleotidov (ang. Single Nucleotide Polymorphism)
SRK	S-receptor kinaza (ang. S-locus receptor kinase)
SSR	ponovitve enostavnih zaporedij (ang. Simple Sequence Repeats)
T <sub>a</sub>	temperatura prileganja (ang. Annealing temperature)
TRIS	trishidroksietilaminometan
UPGMA	metoda aritmetičnega povprečja neutežnih parov (ang. Unweighted Pair Group Method)
3' UTR	3' nekodirajoča regija (ang. 3' untranslated region)
5' UTR	5' nekodirajoča regija (ang. 5' untranslated region)
WOGC	svetovna kolekcija dednine oljke (ang. World Olive Germplasm Collections)

## SLOVARČEK

BLAST	lokalni algoritem poravnave BLAST (ang. Basic Local Alignment Search Tool)
BlastX	lokalni algoritem, ki znano nukleotidno zaporedje prevede v aminokislinsko in ga primerja z zbirkо aminokislinskih zaporedij v proteinski bazi NCBI
cDNA	DNA sintetizirana iz zrele mRNA
Indel	mutacija, pri kateri se doda (insercija) ali odstrani (delecija) en ali več baznih parov
samooplodna sorta	sorta, ki za uspešno oploditev ne potrebuje peloda drugih sort
samoneoplodna sorta	sorta, ki za uspešno oploditev potrebuje pelod drugih sort
<i>Taq</i> polimeraza	encim DNA polimeraza, izoliran iz organizma <i>Thermus aquaticus</i>
transkriptom	skupina vseh mRNA, ki so v danih razmerah izražene v celici, populaciji celic ali v celotnem organizmu

## 1 UVOD

Oljko (*Olea europaea* L.) že tisočletja gojimo na območju sredozemskega bazena in je, takoj za palmovim oljem, druga najpomembnejša gojena rastlina za pridelavo olja. V zadnjih letih znaša letna proizvodnja namiznih oljk 2,5 milijonov ton, kar 19 milijonov ton oljk (FAOSTAT<sup>1</sup>, 2016) pa se predela v 2,91 milijonov ton oljčnega olja (IOC<sup>2</sup>, 2016). Tudi v sredozemskem delu Slovenije je oljka gospodarsko pomembna sadna vrsta. Trenutno uspeva na 2068 ha zemljišč (Služba za Register kmetijskih gospodarstev, 2016). Največje pridelovalno območje se nahaja v Slovenski Istri, v porastu pa so tudi nasadi v Goriških Brdih. V prihodnosti je pričakovati povečanje hektarskih površin, zasajenih z oljko do 2600 ha, zlasti na zemljiščih v zaraščanju, saj je zanimanje za gojenje oljk med prebivalci slovenskega Primorja veliko (Bandelj in sod., 2006). V slovenskih oljčnih nasadih je najbolj zastopana sorta ‘Itrska belica’. Po pozobi leta 1956 se je pričela naglo širiti v istrske oljčnike, ker je dobro prilagojena pedoklimatskim razmeram, še posebej nizkim temperaturam. V oljčnikih sicer še vedno najdemo stare lokalne sorte, a jih vse pogosteje zamenjujejo ‘Itrska belica’ ali vnesene sorte iz Italije in Španije (Bandelj in sod., 2002).

Danes je večina genetskih raziskav na gojenih rastlinah osredotočenih na razumevanje genetskega ozadja fizioloških in razvojnih procesov ter na izboljšanje kakovosti in količine pridelka. Kljub socialno-ekonomski pomembnosti in koristnim zdravilnim učinkom, ki so povezani z uživanjem oljčnega olja, je v glavnih genskih podatkovnih bazah na voljo relativno malo podatkov o nukleotidnih zaporedjih genov in genskih produktih oljke (Galla in sod., 2009). Žlahtnjenje oljke večinoma zaostaja za drugimi pomembnejšimi sadnimi vrstami zaradi dolge juvenilne dobe sejancev po križanju sort, samooplodnosti nekaterih sort in ohranjanja sort z vegetativnim razmnoževanjem. Za izboljšanje programov žlahtnjenja in napredek na področju genomskeih študij oljke je velikega pomena osnutek genoma oljke, ki so ga nedavno objavili Cruz in sod. (2016). V zadnjih letih je pri kmetijskih rastlinah opaziti večja prizadevanja za razvoj zbirk izraženih nukleotidnih zaporedij (ESTs<sup>3</sup>). Zaporedja EST so naključno izbrani prepisi nukleotidnih zaporedij, pridobljeni iz cDNA knjižnic in so še posebej zanimivi za razvoj markerjev, saj predstavljajo izražene regije v genomu (Sahu in sod., 2012). Javno dostopne zbirke zaporedij EST služijo kot vstopna točka za sistematično identifikacijo in razvoj mikrosatelitskih markerjev ali SSR<sup>4</sup> s pomočjo bioinformatskih orodij (Huang in sod., 2011). Markerji EST-SSR so neposredno povezani z izraženimi geni in tako popolnoma vezani z domnevнимi kvalitativnimi in kvantitativnimi lokusi (QTL<sup>5</sup>), zato jih imenujemo tudi ‘funkcijski ali genski molekulski markerji’. Za izboljšanje genskih virov oljk sta nujno

---

<sup>1</sup> Ang. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistics Division

<sup>2</sup> Ang. International Olive Council

<sup>3</sup> Ang. Expressed Sequence Tags

<sup>4</sup> Ang. Simple Sequence Repeats

<sup>5</sup> Ang. Quantitative Trait Loci

potrebni tako identifikacija novih genov, povezanih z agronomsko pomembnimi lastnostmi, kot tudi razvoj molekulskega markerja vezanega na te gene. V ta namen želimo identificirati nove genske markerje SSR, in sicer iz transkriptov EST, ki jih je v okviru nacionalnega projekta nedavno razvila slovenska raziskovalna skupina (SRX215662, 2012; Rešetič in sod., 2013).

V preteklosti je globalizacija kmetijstva pripomogla h genski eroziji, saj je dajala prednost gojenju najbolj donosnih oljčnih sort in s tem zožila genetski material na nekaj sort. Za preprečitev nadaljnje izgube dragocenih oljčnih sort v Sloveniji, ki s stališča žlahtnjenja oljke predstavljajo nacionalni genski bazen, se je v 90. letih pričelo z inventarizacijo sort na terenu. Od pričetka inventarizacije je bilo na terenu evidentiranih 169 dreves različnih sort oljk in približno 25 % se jih trenutno nahaja v dveh nacionalnih kolekcijskih nasadih v Strunjanu in na Purissimi v Ankaranu. Vsi zbrani fenotipi so bili morfološko opisani, opravljene so bile tudi določene kemijske analize oljčnega olja, ni pa še bila opravljena molekulska karakterizacija. Naš namen je, da s pomočjo molekulskega markerja izdelamo genetske DNA profile zbranih fenotipov in tako dopolnimo obstoječo podatkovno bazo ter sklenemo desetletne raziskave genskih virov oljke v Sloveniji. Pri upravljanju z genskimi viri je namreč izredno pomembno, da se na pridelovalnem območju zajezi in ohrani obstoječo diverzitetno gojenih rastlin in njihovih divjih sorodnikov (Börner, 2006).

Področje, ki je pri oljki izrazito slabo proučeno, je kompatibilnost oljčnih sort, ki pa je ključnega pomena za doseganje rodnosti v oljčnih nasadih. Kljub dolgi zgodovini gojenja oljke so, tako med raziskovalci kot pridelovalci, še vedno prisotne dileme glede kompatibilnosti in uspešne fertilizacije pri oljčnih sortah. Čeprav so si v številnih študijah enotni o prednostih navzkrižnega oprševanja, niti za najpomembnejši svetovni oljčni sorti, kot sta 'Frantoio' in 'Leccino', še vedno ni povsem jasno, kateri so njihovi najbolj učinkoviti oz. priporočljivi donorji peloda (Seifi in sod., 2015; Guerin in Sedgley, 2007). Oljčna drevesa zelo obilno cvetijo, a le 1-2 % cvetov se razvije v plodove. Na splošno velja, da je oljka samoneoplodna, dodatno pa prihaja tudi do nekompatibilnosti med posameznimi sortami. Čeprav so vzroki za nerodnost lahko tudi fiziološke narave, bi žeeli z ustreznnimi molekularnimi metodami določiti najpogosteje oprševalne sorte za najbolj zastopano oljčno sorto v Sloveniji, 'Istrsko belico'. V praksi je sorta poznana kot samooplodna, kar pomeni, da za uspešno oploditev ne potrebuje peloda drugih sort. Kljub temu pa v literaturi zasledimo, da je oploditev bistveno boljša v primeru tujega oprševanja (Sancin, 1990; Barranco in sod., 2000). Pri slovenskih sortah so oprševalni odnosi neraziskani, poleg tega pa spremenjene vremenske razmere in s tem podnebje v času cvetenja dodatno vplivajo na čas in dolžino cvetenja in na hitrost rasti pelodnega mešička ter s tem na uspešnost oploditve.

Osrednji namen doktorskega dela je razvoj novih lokusno specifičnih markerjev EST-SSR in posledično povečanje razpoložljivosti genskih markerjev pri oljki. Vsi razviti pari

začetnih oligonukleotidov bodo preko javnih podatkovnih baz na voljo tudi drugim raziskovalnim skupinam in bodo tako prispevali k boljšemu poznavanju strukturne in funkcijске genomike pri oljki. Povečanje števila genskih markerjev bo ključnega pomena tudi za kartiranje genoma oljke, ki v primerjavi s pomembnejšimi kmetijskimi vrstami močno zaostaja in bo hkrati pripomoglo k hitrejšemu žlahtnjenju oljke. Z določitvijo najpogostejših opaševalnih sort 'Itrske belice' bomo skušali rešiti dilemo o samooplodnosti te sorte. Poznavanje opaševalnih odnosov pri 'Itrske belici' bo tudi izrednega pomena pri pripravi novih ali sanaciji slabo rodnych nasadov, saj lahko le premišljena sortna sestava vodi do višjih in rednih pridelkov brez uporabe drugih agrotehničnih ukrepov.

Ker je osrednji namen doktorskega dela povečanje števila razpoložljivih markerjev EST-SSR oljke ter njihova aplikacija za genetske raziskave oljke, smo si zastavili naslednje raziskovalne hipoteze:

- v skladu z dosedanjimi raziskavami predpostavljam, da bomo v transkriptomu oljke odkrili tetranukleotidne, trinukleotidne in dinukleotidne mikrosatelitske motive;
- predpostavljam, da bomo pri genskih mikrosatelitih odkrili nižji nivo polimorfizma v primerjavi z genomske mikrosatelite;
- predpostavljam, da bomo z razvitimi mikrosatelitskimi markerji ocenili genetsko variabilnost oljčnih sort v Sloveniji;
- predpostavljam, da bomo z novimi mikrosatelitskimi markerji uspešno razvili test starševstva za 'Itrsko belico'.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 OLJKA

#### 2.1.1 Botanična klasifikacija oljke

Oljka (*Olea europaea* L.) pripada monofletski družini Oleaceae (oljkovke). Družina Oleaceae je srednje velika in vključuje 25 rodov s 600 različnimi vrstami. Od tega je mnogo rodov pomembnih z agronomskoga in/ali ekonomskoga vidika: *Fraxinus*-jesen se goji za les, robove *Jasminum*-jasmin, *Forsythia*-forzicija, *Syringa*-španski bezeg in *Ligustrum*-kalina gojijo za okrasne namene, a le oljka, ki spada v rod *Olea*, ima užitne plodove (Wallander in Albert, 2000).

Čeprav botanična klasifikacija oljke še ni povsem definirana, so si številni sodobni avtorji enotni, da je rod *Olea* razdeljen v tri podrobove *Tetrapilus* (Azija), *Paniculatae* (Avstralija in Azija) in *Olea* (Afrika in Evropa) (Rugini in sod., 2011). Podrod *Olea* se nadaljnje deli na dve sekciji: *Ligustroides* in *Olea*, ki uspevata v hribovitem delu vzhodne Afrike in na Pacifiških otokih, med tem ko sekcijsko *Olea* najdemo tudi v zahodni Sahari, na Kanarskih otokih in Madeiri ter na območju sredozemskega bazena. Sekcija *Olea* pa vključuje t.i. kompleks *Olea europaea*, znotraj katerega je identificiranih šest podvrst (Slika 1), značilnih za določeno geografsko območje (Green, 2002).

<b>Kraljestvo:</b>	<i>Plantae</i>
<b>Deblo:</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Razred:</b>	<i>Rosopsida</i>
<b>Red:</b>	Lamiales
<b>Družina:</b>	<i>Oleaceae</i>
<b>Poddružina:</b>	<i>Oleideae</i>
<b>Rod:</b>	<i>Olea</i>
<b>Podrobovi:</b>	<i>Paniculatae</i> <i>Tetrapilus</i> <i>Olea</i>
<b>Sekciji:</b>	<i>Ligustroides</i>
<b><i>Olea</i> (kompleks <i>Olea europaea</i>)</b>	
<b>Podvrste:</b>	<i>cuspidata</i> <i>laperrinei</i> <i>maroccana</i> <i>cerasiformis</i> <i>guanchica</i> <i>europaea</i> varieteti: <i>sylvestris</i> (divja oljka) <i>europaea</i> (gojena oljka)

**Slika 1:** Taksonomska shema oljke (*Olea europaea* L.) (Green, 2002)

**Figure 1:** Taxonomic scheme of olive (*Olea europaea* L.) (Green, 2002)

Podvrsta *cuspidata* se nahaja na območju od Arabskega polotoka do severne Indije in vzhodne Kitajske ter na območju od Egipta do Južne Afrike, od koder je bila vnesena na vzhodni del Avstralije in na Havaje; podvrsta *laperrinei* je razširjena na območju Sahare (gorovje Ahagar, Aïr in Jebel Marra ter Alžirija); podvrsta *maroccana* je razširjena v Maroku; podvrsta *cerasiformis* se nahaja na otoku Madeira; podvrsta *guanchica* je značilna za Kanarske otoke; podvrsta *europaea* pa je poznana kot vrsta sredozemskega bazena (Besnard in sod., 2007a).

Oljka (*Olea europaea* L. podvrsta *europaea*) vključuje gojeno oljko (*O. europaea* podvrsta *europaea* varieteta *sativa*) in divjo oljko (*O. europaea* podvrsta *europaea* varieteta *sylvestris*), imenovano tudi *oleaster*. Divje oljke imajo ozko območje razširjenosti in se jih pogosto zamenjuje s podivjanimi oljkami, za katere je značilno, da izvirajo iz semen gojenih oljk ali pa so nastale s spontanim križanjem med divjimi in gojenimi oljkami (Zohary in Hopf, 2000). Do zamenjav prihaja predvsem zato, ker pravih divjih oljk in podivjanih oljk ni moč razlikovati na podlagi njihovih morfoloških značilnosti. Lumaret in Ouazzani (2001) sta z izoencimskimi markerji, povezanimi z lastnostmi, zaradi katerih so rastline neprimerne za domestikacijo (podaljšana juvenilna faza), ugotovila, da prave divje oljke še vedno uspevajo v posameznih sredozemskih gozdovih, in sicer na jugu Francije in Španije, v severnem delu Maroka in Tunizije, na Korziki, Siciliji in Cipru ter v Palestini. Rezultati študije so tudi pokazali, da se populacije oleastrov na vzhodnem delu sredozemskega bazena genetsko bistveno razlikujejo od zahodnih populacij oleastrov. Oleastri na vzhodnem delu sredozemskega bazena naj bi bili genetsko zelo podobni sortam, ki se jih goji v Sredozemlju, zahodne populacije oleastrov pa naj bi bile bolj sorodne divjim populacijam s Kanarskimi otokov (*O. europaea* L. podvrsta *guanchica*). Obstojče oljke, ki so na videz divje, tvorijo kompleks divjih in podivjanih oblik oljk, kar je posledica zgodnje domestikacije in obsežnega gojenja oljke na območju sredozemskega bazena (Lumaret in Ouazzani, 2001).

### 2.1.2 Razširjenost oljke v svetu

Gojena oljka (*Olea europaea* L.) je zimzelena in tujeprašna, razmnožuje se vegetativno in zanjo je značilna velika genetska raznolikost, ki je posledica dolgega življenja rastline in ohranjanja genotipov skozi več stoletij gojenja (Fabbri in sod., 2009). Časovna in geografska opredelitev začetka domestikacije oljke sta še vedno predmet razprav. Besnard in sod. (2013) so na podlagi primerjave polimorfizma plastidne DNA divjih in gojenih oljk, vzorčenih na območju celotnega sredozemskega bazena, zaključili, da se je domestikacija oljke začela na območju med Turčijo in Sirijo, pred več kot 7000 leti. Temu je sledilo širjenje domestikacije oljke po celotnem sredozemskem bazenu, in sicer vzporedno s širjenjem civilizacije in s preseljevanjem ljudi. Čeprav so mnogi avtorji na podlagi genetskih raziskav ugotovili, da naj bi šlo pri oljki za več območij izvora (Baldoni

in sod., 2006; Besnard in sod., 2007b; Breton in sod., 2009, Belaj in sod., 2012), so Besnard in sod. (2013) mnenja, da lahko to pojasnimo s t.i. sekundarno domestikacijo, ki je vključevala križanje med novimi oljčnimi sortami in lokalnimi oleastri v celotnem Sredozemlju.

Oljka je najbolj razširjena gojena sadna vrsta in po podatkih Organizacije Združenih narodov za prehrano in kmetijstvo (FAOSTAT, 2016) oljčni nasadi v svetovnem merilu pokrivajo okoli 10,3 milijone ha površin. Čeprav danes oljke gojijo na različnih delih sveta (Afganistan, Argentina, Avstralija, Azerbajdžan, Brazilija, Čile, Iran, Irak, Južna Afrika, Jordanija, Kitajska, Kuvajt, Makedonija, Mehika, Palestina, Peru, Portugalska, Salvador, Urugvaj, Uzbekistan, Združene države Amerike), je največji del gojenja oljk (98 %) še vedno skoncentriran na območju sredozemskega bazena. Največja proizvajalka je Španija, s skupno pridelovalno površino 2,515,000 ha, na drugem mestu je Italija (1,156,000 ha) in za njo še Grčija (945,000 ha). V letu 2015 je svetovna proizvodnja oljčnega olja znašala 2,99 milijona ton. Od tega je 44 % proizvedla Španija, 12 % Italija in 10 % vse svetovne proizvodnje Grčija (IOC, 2016). Poraba oljčnega olja na prebivalca ni sorazmerna s pridelovalno površino. Po podatkih Mednarodnega sveta za oljkarstvo (IOC, 2016) je bila letna poraba oljčnega olja na prebivalca v letu 2014 največja v Grčiji (12,8 kg) ter nekoliko nižja v Španiji (11,3 kg) in Italiji (10,5 kg), v Sloveniji pa je znašala 1,0 kg. Zaradi ugodne sestave maščobnih kislin in zdravilnih učinkov številnih biološko pomembnih spojin, ki jih vsebujejo oljčni plodovi (Pérez-Jiménez in sod., 2007), se je uživanje oljčnega olja razširilo tudi izven držav proizvajalk. V Švici je bila leta 2014 letna poraba oljčnega olja na prebivalca 1,6 kg, v Kanadi 1,1 kg, manj kot kilogram pa na Norveškem, Japonskem, Tajvanu, v Saudski Arabiji, Braziliji, Čilu, Rusiji in v Mehiki.

Po podatkih Podatkovne baze oljk<sup>6</sup> je število gojenih sort ocenjeno na 1250, ki jih gojijo v 54 državah in so zbrane v 100 kolekcijskih nasadih (Bartolini in sod., 2008). Verjetno pa je število različnih oljčnih sort še večje, saj navedena ocena ne vključuje podatkov o številnih lokalnih sortah in ekotipih (Cantini in sod., 1999). Če upoštevamo še slednje, naj bi bilo po zadnjih ocenah 2629 različnih sort oljk (FAO, 2010). Sortna struktura oljke se je izoblikovala v več stoletjih s selekcijskim pritiskom naravnega okolja in človeka, ki je odbiral genotipe z boljšimi agronomskimi lastnostmi ter s spontanim križanjem gojenih in divjih oljk (Rugini in Baldoni, 2005). V svetovnem merilu za ohranjanje genskih virov oljke skrbita dve svetovni kolekciji dednine oljke (WOGC<sup>7</sup>). Prva je bila ustanovljena leta 1970 v Španiji (Córdoba), kjer naj bi bilo zbranih 499 akcesij iz 21 držav (Caballero in sod., 2006), vendar so kasneje, s pomočjo mikrosatelitskih markerjev in morfoloških karakteristik, zaključili, da gre po vsej verjetnosti za 332 različnih sort (Trujillo in sod., 2014). Druga svetovna kolekcija je bila vzpostavljena leta 2002 v Maroku (Marrakech). Prvotno naj bi kolekcija vključevala 561 oljčnih sort iz 14 držav, ki pa so se na podlagi

---

<sup>6</sup> Ang. OLEA databases

<sup>7</sup> Ang. World Olive Germplasm Collections

genotipizacije s 17 mikrosatelitskimi lokusi razvrstile v 502 različna mikrosatelitska profila (El Bakali in sod., 2013). Za dodatno zaščito raznolikosti oljke je bila aprila 2012 na sestanku Mednarodnega sveta za oljkarstvo sprejeta odločitev o vzpostavitvi tretjega kolekcijskega nasada. Med petimi državami kandidatkami je bila izbrana Turčija (Izmir), ki je dovolj oddaljena od obstoječih svetovnih kolekcij, da se rastlinam v primeru naravnih katastrof ali zaradi pojava bolezni zagotovi preživetje (Belaj in sod., 2016).

### **2.1.3 Oljkarstvo v Sloveniji**

Oljka je tudi v Sloveniji gospodarsko pomembna sadna vrsta. Ko govorimo o oljkarstvu v Sloveniji, imamo v mislih predvsem Slovensko Istru, ki jo je oljkarstvo zaznamovalo skozi čas. V Istri naj bi se gojenje oljke začelo 600 let pr. n. št., ko so Feničani prinesli oljko na obalo severnega Sredozemlja, saj so njihovi trgovci v tistem času menjavali blago južnega Sredozemlja za jantar iz severne ležečih območij Sredozemlja. Do pomembnejšega razvoja in napredka oljkarstva je prišlo v 16. in 17. stol. pod oblastjo Benečanov in nato Francozov. Za napredek oljkarstva si je prizadevala tudi avstrijska oblast, na kar kaže ustanovitev t.i. »kemijskih preskuševališč« v Gorici in Kopru konec 19. stol. ter podatek, da je bilo v Slovenski Istri takrat posajenih okoli 320.000 oljčnih dreves (Adamič, 1998; Darovec, 1998). Obdobju razvoja in napredka je konec 19. in v začetku 20. stol. sledil preobrat, ki sta mu botrovali večji pozebi leta 1929 in 1932 (Meze, 1959) ter spremenjene gospodarske razmere. Ljudje so množično odhajali na delo v Trst, v industriji so oljčno olje nadomestila mineralna olja in prišlo je do intenzivnejšega pridelovanja zgodnje in pozne zelenjave (Adamič, 1998). Do ponovnega vzpostavljanja oljčnih nasadov je prišlo leta 1952, a že štiri leta kasneje (1956) se je obnova nekoliko ustavila, saj je do tal pozebno približno 30 % dreves. Do srede osemdesetih let je bilo obnovljenih 70 ha oljčnikov, nato pa je pozeba leta 1985 ponovno prizadela 60 % oljčnikov in posledično zmanjšala pridelek za 80 % (Ogrin, 2004).

Kljub številnim vzponom in padcem, ki ga je doživelo oljarstvo, je v Slovenski Istri uspela revitalizacija gojenja oljke (Bandelj in sod., 2004). Intenziviranje oljkarstva je zaznati od leta 1991 dalje, ko se je začelo obdobje večjih obnov oljčnikov in je trajalo do leta 2005, ko je država ukinila podporo za obnovo nasadov. Po podatkih Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano RS, ki z orto-foto posnetki beleži dejansko rabo tal, je bilo v letu 2015 v Sloveniji z oljkami zasajenih 2068 ha zemljišč (Služba za Register kmetijskih gospodarstev, 2016). Največje pridelovalno območje se nahaja v Slovenski Istri (95 %), kjer ima tudi najdaljšo tradicijo. V porastu pa so tudi nasadi na Goriškem in v Goriških Brdih ter ponekod v Vipavski dolini. V prihodnosti je pričakovati povečanje hektarskih površin, zasajenih z oljko, do skupne površine 2600 ha (Bandelj in sod., 2006), zlasti na zemljiščih v zaraščanju, saj je zanimanje za gojenje oljk med prebivalci slovenskega Primorja veliko. Vendar Ogrin (2010) opozarja, da bo v prihodnje potrebna velika

previdnost pri širjenju oljke in potrebno se bo držati zgodovinsko preverjenih območij in leg. Po podnebnih napovedih za 21. stol. bo verjetnost ekstremnih vremenskih dogodkov večja, kar pomeni, da bo tudi v Sloveniji pogostost nevarnih pozab takoj do sedaj, če ne pogosteješa.

Zaradi manj ugodnih zemljiških razmer, kot so majhna posestna struktura, razdrobljenost in terase, so oljčni nasadi v povprečju majhni (0,32 ha) in le 4 % oljčnikov je večjih od enega hektarja. Slovenska pridelava oljčnega olja znaša na letni ravni povprečno od 500 do 700 ton, čeprav bi lahko, glede na število in starost oljčnih dreves, letno proizvedli tudi 1.000 ton oljčnega olja (Podatki o oljkarstvu v Sloveniji, 2016). V primerjavi z drugimi državami proizvajalkami oljčnega olja v Evropski Uniji, proizvede Slovenija sicer zanemarljivo količino oljčnega olja, a le-to dosega visoko kakovost. To potrjuje tudi zaščitena označba porekla 'Ekstra deviško oljčno olje Slovenske Istre', s katero se je oljčno olje kot prvo slovensko živilo vpisalo v register živil EU (Uredba Komisije (ES) št. 148/2007). Zanemarljiv je tudi izvoz slovenskega oljčnega olja, med tem ko se ga okoli 1.500 ton (95 %) uvozi iz držav članic EU.

Posebnost slovenskega oljkarstva je tudi sortni izbor, ki se je v preteklosti močno spremenil. Spremembam so botrovale periodične pozebe, težke gospodarske razmere pred 2. svetovno vojno in pomanjkanje lastnega sadilnega materiala po vojni. Pred 2. svetovno vojno so bile na Slovenskem najbolj razširjene sorte 'Buga', 'Mata', 'Štorta', 'Drobnica', 'Črnica', 'Žižula', 'Samec', 'Zmartel' in druge. Danes so v nasadih te sorte slabo zastopane, nekatere lahko najdemo le kot posamezna drevesa v tradicionalnih nasadih (Bandelj in sod., 2002). Zaradi pomanjkanja lastnega sadilnega materiala so leta 1952 v prve urejene oljčnike posadili toskanske sorte ('Toskanska belica', 'Leccino', 'Santa Caterina', 'Pendolino', 'Moraiolo', 'Frantoio'). Po pozebi leta 1956 so bile tradicionalne sorte večinoma precepljene z udomačeno sorto 'Itrska belica' (Slika 2), ki je odlično prilagojena pedoklimatskim razmeram, še posebej nizkim temperaturam. Poleg tega so bile zaradi pomanjkanja lastnega sadilnega materiala v slovenski prostor vnesene sorte iz Italije, Španije in Francije (Bandelj in sod., 2002). Po uradnih podatkih v Sloveniji prevladuje 'Itrska belica' (60 %), ki ji sledi toskanska sorta 'Leccino' (23 %) in njena oprševalna sorta 'Pendolino' (2 %), ostalih 15 % pa predstavljajo avtohtone in druge vnesene sorte (MKGP, 2011). Po oceni strokovnih služb pri Kmetijsko gozdarskem zavodu Nova Gorica pa naj bi bila 'Itrska belica' na terenu zastopana s 65 % (Vesel in sod., 2016).

Da bi preprečili izgubo dragocenih genotipov, ki predstavljajo nacionalni genski bazen, se je v 90. letih v Sloveniji začelo z inventarizacijo sort na terenu, in sicer v okviru strokovnih nalog Poskusnega centra za oljkarstvo (KGZS - Zavod Nova Gorica) in projekta RESGEN (»Project on conservation, characterisation, collection and utilisation of genetic resources in olive« v sodelovanju z Mednarodnim svetom za oljke IOC). Evidentirana drevesa s

posebnimi morfološkimi lastnostmi so služila kot izhodišče za vzpostavitev dveh nacionalnih kolekcijskih nasadov. Prvi je bil vzpostavljen v Strunjanu leta 1995 in drugi na Purissimi v Ankaranu leta 2004. V kolekcijskih nasadih poteka vrednotenje agronomsko pomembnih lastnosti genotipov, kot so rast, rodnost, odpornost na sušo, bolezni in škodljivce ter kakovost oljčnega olja. Bandelj in sod. (2002) so v kolekcijskem nasadu v Strunjanu nadgradili vrednotenje agronomskih in kakovostnih lastnosti, saj so večino sort identificirali tudi z mikrosatelitskimi markerji. Genotipizacija in potrditev sadilnih mest v kolekcijskem nasadu v Strunjanu ter na Purissimi je bila opravljena v okviru Ciljno-raziskovalnega projekta ‘Determinacija in vrednotenje genskih virov oljk v nacionalnih kolekcijah Slovenije z uporabo markerjev DNA’ (V4-1056, 2012). Tretja *in situ* kolekcija oljk se nahaja na Form vivi v Portorožu in četrta v Šempetru pri Novi Gorici. Vsi štirje nasadi so pomembni v kontekstu vzdrževanja nacionalne genske banke oljke.



**Slika 2:** Oljčna sorta ‘Istrska belica’ (foto: D. Bandelj, 2005)  
**Figure 2:** Olive variety ‘Istrska belica’ (photo: D. Bandelj, 2005)

## 2.1.4 Biološke značilnosti oljke

### 2.1.4.1 Morfologija

Oljka je od 15 do 20 m visoko vednozeleno drevo, s široko, zračno in močno razvejano krošnjo. Deblo mladega drevesa je v prerezu običajno okroglo, skorja debla pa je srebrno

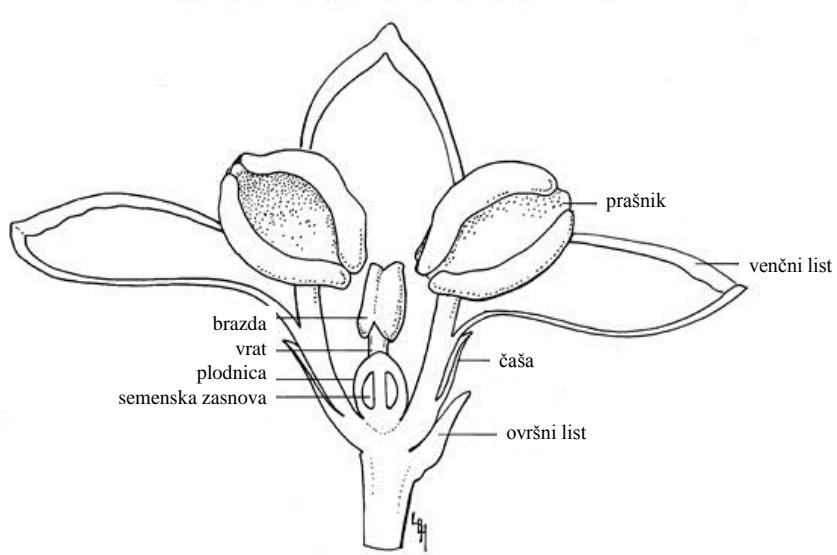
siva in gladka. Skorja debla v starosti potemni in razpoka, deblo starejših dreves pa je zaradi grč ali hiperplazij v prerezu praviloma nepravilnih oblik. Koreninski sistem je močan, sorazmerno plitek in zato dobro razvit predvsem v širino. V ugodnih talnih razmerah segajo korenine pri starejših drevesih v povprečju do globine od 0,6 do 0,7 m. Površinski koreninski sistem je značilen za vegetativno (z delom rastline) razmnožene oljke in se po nastanku grč redno obnavlja iz nadomestnih brstov. Med tem ko generativno (iz semena) razmnožene oljke v začetku razvijejo glavno (primarno) korenino, ki prodira globlje, nato pa začnejo sočasno z nastajanjem grč razvijati še površinski sekundarni koreninski sistem, ki prevzame vlogo primarne korenine. Brsti na deblu in vejah so drobni, zašiljeni, sivozeleni in brez luskolistov. Poznamo zimske brste, iz katerih se razvijejo vegetativni poganjki in socvetja (poganjki s cvetnimi brsti) ter mnogo adventivnih (nadomestnih) brstov, iz katerih ob poškodbi ali stresu hitro poženejo novi poganjki. Navzkrižno razporejeni listi so vednozeleni in se zamenjajo na približno 2-3 leta. So enostavnii, podolgovato-suličasti, dolgi 4-8 cm in široki 0,9-1,8 cm. Listna ploskev je ravna ali različno zasukana, odvisno od sorte. Listi so trdi in usnjati, zgoraj motno zeleni, spodaj pa zaradi gostih kratkih dlačic značilno srebrno sivi (Brus, 2004; Therios, 2009).



**Slika 3:** Socvetja oljke z odprtimi cvetovi (foto: D. Bandelj, 2007)  
**Figure 3:** Olive inflorescences with open flowers (photo: D. Bandelj, 2007)

V zalistju poganjkov, ki so zrastli v prejšnjem vegetacijskem obdobju, rastejo grozdasta socvetja. V posameznem socvetju (Slika 3) je navadno med 15 in 30 (Martin in Sibbett, 2005) dvospolnih in sterilnih (funkcionalno moških) cvetov, katerih število variira v odvisnosti od sorte, lege poganjka na veji in od podnebnih razmer. Dvospolni cvetovi oljke

(Slika 4) so drobni, dišeči, beli in 4-števni. Imajo 4-zobo čašo, 4-krpat venec, 2 prašnika z velikimi prašnicami in pestič z nadraslo plodnico. Plodnico sestavlja dva zrasla plodna lista in vsak od njiju vsebuje po dve semenki zasnovi. Vrat pestiča je kratek, v povprečju dolg 0,4 mm, plodnica pestiča pa je velika, s povprečno dolžino 3,3 mm (Martin, 1994; Brus, 2004; Therios, 2009).



**Slika 4:** Prečni prerez cveta oljke, 20x povečava (McGregor, 1976)  
**Figure 4:** Longitudinal section of olive flower, x20 (McGregor, 1976)

Plod oljke (oljka) je koščičast, okrogle ali ovalne oblike in dolg 1-3 cm. Plod sestavljajo kožica (eksokarp) z rezami, mesnato in z oljem bogato osemenje (mezokarp) ter podolgovata koščica (endokarp), ki vsebuje eno do dve semenki (endosperm). Plod je sprva zelene barve, pozneje največkrat rjavo–rdečkast, popolnoma zrel pa temno moder ali skoraj črn in po površini bleščeč. Pri nekaterih sortah pa so tudi zreli plodovi zelenkasti (Brus, 2004; Therios, 2009).

#### 2.1.4.2 Cvetenje

Začetek fenofaze cvetenja oljke in njeno trajanje sta odvisni od podnebnih razmer pred cvetenjem in v času cvetenja ter od sorte oljke. Oljka cveti v mesecu maju in juniju, najpogosteje v drugi polovici maja in prvi polovici junija. Na posameznem socvetju traja cvetenje običajno 2-3 dni, na posameznem drevesu 5-6 dni, v hladnejših sezona pa se lahko cvetenje podaljša tudi na 10-15 dni (Fabbri in sod., 2004). Pri fenofazi cvetenja oljke ločimo tri obdobja: začetek cvetenja, čas polnega cvetenja in konec cvetenja (Sanz-Cortéz in sod., 2002). Na začetek fenofaze cvetenja vplivajo letne temperaturne spremembe. Po daljšem obdobju izpostavljenosti nizkim temperaturam (<7,2 °C), ki so potrebne za

prekinitev obdobja mirovanja cvetnih brstov (Rallo in Martin, 1991), se pri oljki pojavijo potrebe po višjih temperaturah. Le-te pa so ključne za razvoj cvetnih brstov od prekinitve mirovanja do cvetenja. Osborne in sod. (2000) so na podlagi eksperimentalnih podatkov in modeliranja na območju Sredozemlja zaključili, da je čas cvetenja oljke močno odvisen od spomladanskih temperatur in bi zato lahko v prihodnje služil kot zelo natančen bioindikator podnebnih sprememb v Sredozemlju. A za diferenciacijo cvetnih brstov in za njihovo končno število so, poleg temperature, odgovorni tudi drugi okoljski dejavniki ter hrani, ravnovesje hormonov in fotosinteza kapaciteta (Lavee, 1996). Znano je, da sta za diferenciacijo cvetnih brstov pri oljki pomembni dve obdobji. Prvo v spomladansko-poletnem času, ko pride do stimulacije cvetnih brstov, verjetno zato, da se prepreči njihovo diferenciacijo v listne brste. In drugo obdobje na prehodu jesen-zima, ko se »kandidatne« brste ponovno spodbudi, da oblikujejo strukture cveta (Lavee in sod., 1996; Fabbri in Benelli, 2000).

Odraslo drevo oljke razvije na leto približno 500.000 cvetov (Martin in sod., 2005), in sicer lahko razvije dva tipa cvetov, popolne in sterilne cvetove. Popolni cvetovi so dvospolni (hermafroditiski) in imajo razvite vse cvetne dele. Sterilni cvetovi so funkcionalno moški cvetovi, z razvitima prašnikoma, plodnica in brazda pestiča pa sta nepopolno razviti ali manjkata (Therios, 2009). Do propada pestiča lahko pride v katerikoli razvojni stopnji (Fabbri in sod., 2004), med tem ko lahko pomanjkanje zadostne količine vode in hrani tekom razvoja cveta vodi v nastanek zakrnelega pestiča (Martin in Sibbett, 2005). Sterilni cvetovi služijo kot vir peloda in tako sodelujejo pri opaševanju, vendar se iz njih ne more razviti plod. Med popolnimi in sterilnimi cvetovi naj ne bi bilo razlik v količini proizvedenega peloda na eni prašnici, v kakovosti proizvedenega peloda (uspešnost kaljivosti) in v uspešnosti peloda pri opaševanju (Cuevas in Polito, 2004). Na delež sterilnih cvetov vplivajo genetski in okoljski dejavniki, zato se število cvetov razlikuje med leti, drevesi, poganjki in celo med socvetji (Lavee in sod., 2002). Tudi na delež popolnih cvetov vplivajo različni dejavniki, kot so sorta oljke, število socvetij na rastlini, vlažnost tal in vsebnost dušika v listih v času diferenciacije cvetov (Therios, 2009). S pojavom sterilnosti je povezan tudi položaj cvetov na posameznem socvetju. Znano je, da se na vrhu socvetja in na njegovih primarnih ali terminalnih cvetnih pecljih (pedicelih) najpogosteje razvijejo popolni cvetovi, med tem ko se na sekundarnih ali lateralnih cvetnih pecljih največkrat razvijejo sterilni cvetovi. Poleg tega je za popolne cvetove značilno, da se v glavnem odprejo v začetnem delu obdobja cvetenja, sterilni cvetovi pa se začno odpirati kasneje. Ko so Seifi in sod. (2008) proučevali pozicijo cvetov na socvetju pri treh oljčnih sortah ('Manzanillo', 'Mission', 'Frantoio'), so s posameznega socvetja odstranili tiste cvetove, ki so rastli na terminalnih cvetnih pecljih in so zato imeli težnjo po razvoju v popolne cvetove. Posledično se je med preostalimi, lateralno nameščenimi cvetovi, zmanjšal delež cvetov z zakrnelim pestičem. To pomeni, da je med cvetovi prisotna kompeticija za hrnilne snovi, ki lahko povzroči višji odstotek deformiranih pestičev na lateralnih cvetnih pecljih.

#### 2.1.4.3 Biologija opašitve in oploditve

Cvetovi oljke proizvajajo velike količine anemofilnih (značilnih za vetrocvetke) pelodnih zrn. Pelodna zrna (Slika 5) so značilne eliptične oblike in imajo mrežasto zunano ovojnico ali eksino, na kateri so vzdolžne vdolbine, ki delijo površino pelodnega zrna na tri enake dele. Dolžina pelodnega zrna je med 23,42 µm in 23,97 µm, premer v ekvatorialni ravnini pa znaša od 17,54 µm do 17,78 µm (Lanza in sod., 1996). Čeprav je oljka vetrocvetna rastlina in ne proizvaja nektarja, privablja različne žuželke, med drugim čebele, ki lahko pomagajo pri opaševanju. Pelodna zrna oljke lahko z vetrom prepotujejo razdalje do 12 km, vendar raziskave kažejo, da naj bi razdalja za učinkovito opašitev (EPD<sup>8</sup>) znašala 30 m (Ayerza in Coates, 2004; Fabbri in sod., 2004).



**Slika 5:** Ultrastruktura pelodnega zrna oljke, 1400x povečava (Lleal, 2016)  
**Figure 5:** Ultrastructure of olive pollen grain, x1400 (Lleal, 2016)

Zrela pelodna zrna oljke se v procesu opašitve sprostijo iz prašnic in se prenesejo na brazdo pestiča. Po uspešni opašitvi pride do oploditve tako, da vegetativno jedro oblikuje pelodni mešiček, ki raste skozi vrat pestiča, vse do odprtine v semenski zasnovi (mikropila), da doseže embrionalno vrečko. Ena spermalna celica se združi z jajčno celico v spojek ali zigoto, ki se začne deliti v kalček. Druga spermalna celica se združi z dvema jedroma v embrionalni vrečki in skupaj se razvijejo v hranilno tkivo, imenovano sekundarni endosperm.

Ekološki dejavniki, ki vplivajo na opašitev in oploditev pri oljki, so temperatura, relativna zračna vlažnost, dež, veter in tudi patogeni, polutanti v zraku ter UV sevanje. Optimalna pogoja za odpiranje prašnic naj bi bila temperatura zraka pod 30 °C in 50 % zračna vlažnost. Zaradi previsokih temperatur se lahko izsuši brazda pestiča, kar vpliva na

---

<sup>8</sup> Ang. Effective pollination distance

receptivnost brazde in na sposobnost pelodnih zrn, da kalijo. Tudi padavine negativno vplivajo na opašitev, saj določajo plazmolizo peloda, ovirajo prenos peloda do brazde pestiča in redčijo brazdni sekret ter s tem zmanjšajo receptivnost brazde. Čeprav je veter ključen za prenos peloda do brazde pestiča, lahko premočan veter odpihne gmote peloda proč od oljčnega nasada, suh in vroč veter pa tako uniči pelodna zrna, da ne pride do kalitve peloda in tvorbe pelodnega mešička (Fabbri in sod., 2004; Martin in sod., 2005).

Ključni dejavnik, ki vodi k uspešni oz. neuspešni oploditvi, je živost ali viabilnost peloda. Viabilnost peloda je definirana kot zmožnost zrelega peloda, da kali oz. razvije pelodni mešiček, ki nato raste in se razvija (Dafni in Firmage, 2000). Uspešnost kalitve peloda je v največji meri odvisna od temperature in optimalna temperatura kalitve je vrstno in sortno specifična. Previsoke temperature upočasnijo ali ustavijo rast pelodnega mešička in lahko izsušijo brazdo pestiča tako, da posledično pelodna zrna ne kalijo. Pri nižjih temperaturah se rast pelodnega mešička prav tako upočasni in pelodni mešiček ne doseže semenske zasnove ali pa jo doseže šele takrat, ko je ta že propadla. Pri večini oljčnih sort naj bi bila optimalna temperatura za kalitev peloda od 20 °C do 25 °C in le pri nekaterih sortah med 25 °C in 30 °C. Pri oljki je vpliv temperature na kalitev peloda sortno specifičen, zato se lahko oljčne sorte glede na občutljivost razvrsti v naslednje skupine: tolerantne, zmerno tolerantne in občutljive na temperaturni stres v času kalitve peloda (Koubouris in sod., 2009). Za uspešno kalitev peloda so pomembni tudi mikroelementi. Zadostna količina bora je potrebna za razvoj prašnic in kasneje za rast pelodnega mešička (Perica in sod., 2001), med tem ko primerna koncentracija kalcijevih ionov vpliva na izločanje iz posebnih veziklov, ki se nahajajo na konici pelodnega mešička in regulirajo njegovo rast (Franklin-Tong, 1999). V zrelih pelodnih zrnih oljke se kopijo tudi oljna telesca ali oleosomi, ki naj bi predstavljeni vir energije za kalitev peloda. Poleg tega imajo oleosomi pomembno vlogo pri prodiranju pelodnega mešička skozi brazdo pestiča in pri rasti pelodnega mešička, saj so vključeni v sintezo prekurzorjev stene pelodnega mešička (Rodríguez-García in sod., 2003a).

#### 2.1.4.4 Samonekompatibilnost in sortna kompatibilnost pri oljki

Za oljko velja, da je nagnjena k izmenični ali alternativni rodnosti, kar pomeni, da lahko v letu, ki sledi dobrni rodnosti, oljka slabo ali sploh ne rodi (Martin, 1990; Cuevas in sod., 1994; Rallo in sod., 1994; Lavee, 2006). Pri oljki je pojav izmenične rodnosti povezan s številnimi spremembami, ki vplivajo na aktivacijo in zaviranje endogenih metabolnih poti. Stopnja izmenične rodnosti je v veliki meri odvisna od okoljskih dejavnikov, zato se lahko, glede na podnebne razmere, zelo razlikuje med pridelovalnimi območji (Lavee, 2006). Izmenična rodnost je povezana tudi s pomanjkanjem vode in hranil v ključnih obdobjih razvoja cvetov in plodov. Tudi obilno cvetenje še ne pomeni nujno dobrega pridelka v smislu kakovosti in količine pridelka, saj nanju vplivajo genetski in okoljski dejavniki

(temperatura, padavine, veter). Poleg tega na uspešnost oploditve bistveno vpliva nekompatibilnost med sortami v času cvetenja in po procesu oprševanja (Cuevas in sod., 2001, 2009). Čeprav je oljka vetrocvetna rastlina s hermafroditiskimi cvetovi, je večina sort samoneoplodnih ali delno samoneoplodnih, kar pomeni, da potrebujejo za uspešno oploditev kompatibilno oprševalno sorto.

Medsebojno križanje zagotavlja vzdrževanje vrste in povečuje genetsko variabilnost potomcev, ki imajo z vidika evolucije večji prilagoditveni potencial kot potomci, ki izvirajo iz samooprašitve. Cvetoče rastline so zato razvile različne mehanizme, ki favorizirajo medsebojno križanje. Eden takih mehanizmov je tudi samonekompatibilnost (SI<sup>9</sup>), kjer po samooprašitvi pelod ne more oploditi spolne celice in tvoriti zigote. Sistem SI lahko na podlagi morfologije cvetov delimo na heteromorfni in homomorfni. Pri heteromorfnem sistemu SI imajo cvetovi ene vrste več različnih morfoloških oblik in posledično je uspešna opršitev možna le med različnimi morfološkimi oblikami cvetov. Pri homomorfnem sistemu SI imajo cvetovi na videz enako strukturo, zato je preprečevanje samooploplidve odvisno od genetskih in biokemičnih mehanizmov, na podlagi katerih se homomorfni sistem SI nadalje deli na gametofitno (GSI) in sporofitno (SSI) kontrolirano zavrnitev peloda. Pri homomorfnih cvetovih je samonekompatibilnost genetsko kontrolirana z enim polimorfnim lokusom, imenovanim S-lokus (Sedgley, 1994; McCubbin in Kao, 1996). Pri mehanizmu GSI je fenotip samoneoplodnosti definiran s haploidnim moškim gametofitom, t.j. s prisotnostjo določenega S-alela v pelodnem zrnu. V vratu pestiča kodira S-lokus protein S-RNAZo, ki prodira v rastočo pelodno cevko in, v primeru nekompatibilnosti s S-proteinom v pelodu, sproži kaskado reakcij, ki vodijo v programirano celično smrt. Pri tem mehanizmu pride do inhibicije rasti pelodnega mešička v točno določeni fazи, in sicer šele po interakciji med pelodom in brazdo pestiča (Newbigin in sod., 1993). Pri mehanizmu SSI je fenotip samoneoplodnosti določen v sporofitnem diploidnem tkivu, kjer poteka produkcija peloda, torej v pelodnih vrečkah. Tekom razvoja pelodnih zrn se iz notranje stene pelodne vrečke ali tapetuma izločajo S-lokus cistein bogati proteini (SCR<sup>10</sup>) (Schopfer in sod., 1999), ki se vežejo na zunanj ovojnico ali eksino pelodnih zrn. In sicer gre za sintezo obeh proteinov, ki jih kodirata S-alela starševskega sporofita, za katera je značilno, da sta lahko v medsebojnem dominantno-recesivnem razmerju. Poleg tega pa S-lokus v pestiču kodira proteina S-lokus glikoprotein (SLG<sup>11</sup>) (Hinata in Nishio, 1978) in S-receptor kinazo (SRK<sup>12</sup>) (Stein in sod., 1991). SRK je transmembranski protein v papilarnih celicah na brazdi pestiča, katerega ekstracelularna domena interagira s proteinom SCR na površini peloda. Ta interakcija sproži večstopenjsko signalno reakcijo, ki prepreči tvorbo pelodne cevke in posledično inhibira samooprašitev. Pri mehanizmu SSI pride do inhibicije tvorbe pelodne cevke že na

---

<sup>9</sup> Ang. Self-incompatibility

<sup>10</sup> Ang. S-locus cysteine-rich protein

<sup>11</sup> Ang. S-locus glycoprotein

<sup>12</sup> Ang. S-locus receptor kinase

brazdi pestiča. Protein SLG pa je podoben ekstracelularni domeni proteina SRK in naj bi služil za podporo in stabilizacijo proteina SRK ter s tem vplival na njegovo povečano aktivnost (Kachroo in sod., 2002).

Pri oljki genetika mehanizma samonekompatibilnosti še vedno ni povsem pojasnjena (Breton in sod., 2014, Seifi in sod., 2015). Nekateri avtorji predpostavljajo, da naj bi bil za oljko značilen gametofitni sistem samonekompatibilnosti (Ateyyeh in sod., 2000; Orlandi in sod., 2005; Serrano in Olmedilla, 2012). Znano je namreč, da ima oljka dvojedrni pelod (Wu in sod., 2002; Rodríguez-García in sod., 2003b), načeloma omočeno brazdo (Ateyyeh in sod., 2000; Wu in sod., 2002), po kalitvi peloda pa pride do inhibicije rasti pelodnega mešička pogosteje v vratu pestiča in ne na površini brazde (Cuevas in Polito, 1997; Ateyyeh in sod., 2000; Orlandi in sod., 2005; Seifi in sod., 2011). Vse naštete morfološke lastnosti so skupne rastlinam, ki imajo razvit mehanizem GSI. Vuletin Selak in sod. (2014) so pri raziskavi sort 'Lastovka', 'Leccino' in 'Oblica' potrdili, da po samooprašitvi pelod kali in šele nato pride do inhibicije rasti pelodne cevke, kar je značilno za gametofitni mehanizem samonekompatibilnosti. Tudi Serrano in Olmedilla (2012) poročata, da pri oljki rast pelodne cevke inhibira S-RNAza, ki je osrednji protein pri mehanizmu GSI. Breton in Bervillé (2012) pa sta na podlagi analize genetskega dedovanja samonekompatibilnosti pri oljki zaključila, da le ta ustreza sporofitnemu modelu. Collani in sod. (2012) so pri oljki prav tako identificirali glavne gene (SRK, SLG in SCR), ki imajo ključno vlogo pri mehanizmu SSI. Tudi po zadnjih raziskavah naj bi bil za oljko značilen sporofitni mehanizem samonekompatibilnosti, ki je odvisen od šestih S-alelov, ti pa so v medsebojnem dominantnem odnosu (Breton in sod., 2014; Farinelli in sod., 2015).

Poleg tega je nekompatibilnost oljke v veliki meri odvisna od vremenskih dejavnikov, zato tudi variira med leti in lokacijami. Znano je, da je raven samonekompatibilnosti oljke odvisna od temperature. Visoka temperatura inhibira rast pelodne cevke v vratu pestiča, ko gre za samooprašitev, med tem ko ima manjši vpliv na rast pelodne cevke tujega peloda (Lavee in sod., 2002, Ayerza in Coates, 2004; Vuletin Selak in sod., 2013). Zato ne preseneča, da so rezultati študij, kjer so proučevali samonekompatibilnost oljčnih sort, zelo raznoliki in v nekaterih primerih celo nasprotujoči. Tako se je sorta 'Frantoio' pri nekaterih raziskavah izkazala kot samokompatibilna (Fontanazza in Baldoni, 1990; Fabbri in sod., 2004), pri drugih kot samonekompatibilna (Wu in sod., 2002; Mookerjee in sod., 2005). Tudi sorta 'Koroneiki' naj bi bila samokompatibilna (Lavee in sod., 2002), Mookerje in sod. (2005) pa so zaključili, da je samonekompatibilna. Poleg samonekompatibilnosti je pri oljki poznana tudi navzkrižna nekompatibilnost oz. nekompatibilnost med sortami. Sorti 'Ascolana tenera' in 'Mission' sta nekompatibilni s sorto 'Manzanillo', sorta 'Baronni' s sorto 'Sevillano' (Martin in sod., 2005), 'Kalamata' pa s sortami 'Arbequina', 'Azapo' in 'Picual' (Seifi in sod., 2012). Tudi tukaj se mnenja delijo. Nekateri avtorji poročajo o obojestranski sortni nekompatibilnosti (Cuevas in Polito, 1997; Martin in sod., 2005), med tem ko druge raziskave kažejo, da temu ni nujno tako (Moutier, 2002; Lavee in sod., 2002).

## 2.2 MOLEKULSKI MARKERJI ZA UPRAVLJANJE GENETSKEGA MATERIALA

Molekulski markerji DNA predstavljajo eno najzmogljivejših diagnostičnih orodij za odkrivanje polimorfizma na ravni specifičnega lokusa in na ravni celotnega genoma. Številni molekulski markerji, ki so na voljo za genotipizacijo rastlin, imajo svoje prednosti in slabosti. Verjetno ni posameznega markerskega sistema, ki bi pri proučevanju rastlinskih genomov dal odgovore na vsa vprašanja. Izbor molekulskih markerjev je zato odvisen od področja raziskovanja in tudi od tehnoloških in finančnih omejitev (Langridge in Chalmers, 2004; Mohler in Schwarz, 2005).

Začetki razvoja molekulskih markerjev segajo v leto 1980, ko je bil razvit prvi markerski sistem RFLP<sup>13</sup> (polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov), ki temelji na razrezu DNA z restrikcijskimi encimi in zaznavanju specifičnih fragmentov DNA s hibridizacijo z radioaktivno označeno sondjo (Botstein in sod., 1980). Z odkritjem tehnologije PCR<sup>14</sup> (verižna reakcija s polimerazo) je prišlo leta 1990 do razvoja markerjev RAPD<sup>15</sup> (naključno pomnožena polimorfna DNA) (Williams in sod., 1990). Prednost markerjev RAPD so bili univerzalni začetni oligonukleotidi, ki so pocenili in skrajšali genetske analize. Ob združitvi prednosti markerskega sistema RFLP in tehnike PCR je prišlo do razvoja markerjev AFLP<sup>16</sup> (polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov) (Vos in sod., 1995), kjer gre za razrez DNA z restrikcijskimi endonukleazami in selektivno pomnoževanje dobljenih restrikcijskih fragmentov. Markerski sistem AFLP se je v veliki meri uporabljal za odkrivanje polimorfizmov iz naključnih regij genoma, za ugotavljanje genetske variabilnosti gojenih in divjih populacij, za kartiranje genomov in za izdelavo kart okoli tistih lokusov, ki so odgovorni za agronomsko pomembne lastnosti (Mohler in Schwarz, 2005). Vsi našteti molekulski markerji niso zadostovali žlahtniteljskim programom, saj ti zahtevajo lokusno specifične markerje. Zato se je fragmente markerjev RFLP, AFLP ali RAPD, povezane z določeno lastnostjo, pretvorilo v t.i. lokusno specifične markerje, kot so markerji CAPS<sup>17</sup> (Konieczny in Ausubel, 1993) in SCAR<sup>18</sup> (Paran in Michelmore, 1993).

V nadaljevanju je prišlo do razvoja mikrosatelitskih markerjev SSR<sup>19</sup> (enostavna ponovljiva zaporedja), markerjev SNP<sup>20</sup> (polimorfizem posameznih nukleotidov), SFP<sup>21</sup> (polimorfizem posamezne lastnosti), DArT<sup>22</sup> (tehnologija raznolikosti mrež) in markerjev,

---

<sup>13</sup> Ang. Restriction Fragment Length Polymorphisms

<sup>14</sup> Ang. Polymerase Chain Reaction

<sup>15</sup> Ang. Randomly Amplified Polymorphic DNA

<sup>16</sup> Ang. Amplified Fragment Length Polymorphism

<sup>17</sup> Ang. Cleaved Amplified Polymorphic Site

<sup>18</sup> Ang. Sequence Characterized Amplified Region

<sup>19</sup> Ang. Simple Sequence Repeat

<sup>20</sup> Ang. Single Nucleotide Polymorphism

<sup>21</sup> Ang. Single Feature Polymorphism

<sup>22</sup> Ang. Diversity Array Technology

ki temeljijo na tehnologiji NGS<sup>23</sup> (naslednja generacija sekvenciranja) (Gupta in sod., 1999; Gupta in Varshney, 2000; Langridge in Chalmers, 2004; Mohler in Schwarz, 2005; Gupta in sod., 2008; Varshney in sod., 2009). Med vsemi so se zelo uveljavili markerji SSR, predvsem zaradi njihove ponovljivosti in prenosljivosti med sorodnimi organizmi in so še vedno nepogrešljivi, saj imajo velik potencial pri spremljanju genov v žlahtiteljskih programih (Gupta in Varshney, 2000; Mohler in Schwarz, 2005). Poleg mikrosatelitskih markerjev, ki so na voljo za večino kmetijskih rastlin, so bili pri številnih rastlinskih vrstah razviti tudi markerji SNP. Markerji SNP bodo verjetno tudi v prihodnje eden od pomembnejših markerskih sistemov, saj jih odlikujejo številčnost, enakomerna porazdelitev v celotnem genomu ter evolucijska stabilnost (Varshney in sod., 2005a) in so zato ključni pri analizi celotnih genomov in za kartiranje kompleksnih lastnosti (Deschamps in Campbell, 2009). Poleg tega se je njihov razvoj pocenil, ko je Sangerejevo metodo nadomestila tehnologija NGS (Varshney in sod., 2009; Metzker, 2010). Med markerji, ki so uporabni za izdelavo mikromrež, so se najbolj uveljavili markerji DArT, ki so pri rastlinah skrajšali in pocenili različne študije, ki so vključevale proučevanje genetske raznolikosti, populacijske strukture, izdelavo genskih kart in identifikacijo lokusov za kvantitativne lastnosti. Poleg omenjenih so še markerji SFP, ki so se izkazali kot zelo koristni pri izdelavi genskih kart in pri odkrivanju funkcionalnih polimorfizmov, povezanih z določenimi lastnostmi (Gupta in sod., 2008). V zadnjih letih je razvoj tehnologije NGS ter v nadaljevanju druge (SGS) in tretje generacije (TGS ali NNGS) sekvenciranja, omogočil razvoj in vrednotenje molekulskih markerjev visoke gostote v populacijah (Varshney in sod., 2009; Davey in sod., 2011). S tehnologijo NGS so se znižali stroški razvoja markerjev SNP (Varshney in sod., 2005a). Ko so ti markerji enkrat identificirani, se jih lahko nato testira z uporabo nizko-, visoko- ali ultra visoko-zmogljivih genotipizacijskih platform, odvisno od potreb raziskovalcev (Deschamps in Campbell, 2009; Varshney in sod., 2009).

Vse omenjene molekulske markerje se je uporabilo v številnih raziskavah na področju rastlinske genetike in žlahtnenja, ki so vključevale genetsko karakterizacijo oz. iskanje prstnih odtisov DNA, gensko kartiranje, selekcijo s pomočjo molekulskih markerjev (MAS<sup>24</sup>) in žlahtnenje s pomočjo molekulskih markerjev. Vendar se v zadnjem času uveljavljajo še sodobnejše genetske in žlahtiteljske metode, kot so npr. asociacijske študije celotnih genomov (GWAS<sup>25</sup>) in selekcija na osnovi celotnega genoma (GWS<sup>26</sup>), ki običajno zahtevajo poznavanje celotnega genoma ali pregledovanje populacij z visoko zmogljivimi markerji (Mir in Varshney, 2013).

---

<sup>23</sup> Ang. Next Generation Sequencing

<sup>24</sup> Ang. Marker-Assisted Selection

<sup>25</sup> Ang. Genome-Wide Association Studies

<sup>26</sup> Ang. Genome-Wide Selection

Napredku molekularne biologije je sledilo tudi oljkarstvo in markerje DNA se danes rutinsko uporablja tako za temeljne kot aplikativne raziskave oljke, natančneje za:

1. analizo genetske variabilnosti oljke z markerji RAPD (Gemas in sod., 2000; Besnard in sod., 2001; Belaj in sod., 2004), AFLP (Belaj in sod., 2004; Bandelj in sod., 2004), SSR (Bandelj in sod., 2004) in ISSR<sup>27</sup> (medmikrosatelitske regije) (Gemas in sod., 2004);
2. filogenetske študije z markerji RFLP (Besnard in Bervillé, 2002; Besnard in sod., 2002a, b), RAPD (Hess in sod., 2000; Bronzini de Caraffa in sod., 2002), AFLP (Baldoni in sod., 2006), SSR (Belaj in sod., 2007; Baldoni in sod., 2009; Erre in sod., 2010), ISSR (Hess in sod., 2000; Vargas in Kadereit, 2001);
3. genotipizacijo sort in karakterizacijo genskih virov oljke z markerji RAPD (Bogani in sod., 1994; Fabbri in sod., 1995; Wiesman in sod., 1998; Belaj in sod., 2001; Guerin in sod., 2002), AFLP (Angiolillo in sod., 1999; Owen in sod., 2005), SCAR (Busconi in sod., 2006), SSR (Sefc in sod., 2000; Bandelj in sod., 2002; Cipriani in sod., 2002; Sabino Gil in sod., 2006; Sarri in sod., 2006; Baldoni in sod., 2009), SNP (Reale in sod., 2006; Muleo in sod., 2009; Santos Macedo in sod., 2009; Hakim in sod., 2010; Kaya in sod., 2013);
4. upravljanje kolekcijskih nasadov z markerji SSR (Bandelj in Javornik, 2007; Omrani-Sabbaghi in sod., 2007; Haouane in sod., 2011; Trujillo in sod., 2014; Muzzalupo in sod., 2014);
5. analizo starševstva z markerji SSR (De la Rosa in sod., 2004; Mookerjee in sod., 2005; Diaz in sod., 2007; Marchese in sod., 2016);
6. pregledovanje izvora in sledljivosti oljčnega olja z markerji RAPD (Muzzalupo in Perri, 2002; Martins-Lopes in sod., 2008), AFLP (Busconi in sod., 2003; Montemurro in sod., 2007), SSR (Martins-Lopes in sod., 2008; Pasqualone in sod., 2007; Alba in sod., 2009; Vietina in sod., 2011; Montemurro in sod., 2015; Ben Ayed in sod., 2016), ISSR (Pasqualone in sod., 2001; Martins-Lopes in sod., 2008).

## 2.2.1 Mikrosatelitski markerji

Mikrosateliti ali markerji SSR so regije DNA, sestavljeni iz tandemsko ponovljenih nukleotidnih zaporedij t. i. osnovnega motiva dolžine od 1 do 6 nukleotidov (Gupta in sod., 1996) in so razporejeni v vseh do sedaj analiziranih prokariontskih in evkariontskih genomih (Zane in sod., 2002). Odlikuje jih ko-dominantna narava, številčnost in razpršenost v genomu, hipervariabilnost in multi-alelne variacije (Powell in sod., 1996; Schlötterer, 2000). Pri rastlinah so mikrosateliti prisotni v kodirajočih in nekodirajočih regijah jedrne DNA, odkriti pa so bili tudi v kloroplastnem (Chung in sod. 2006) in

---

<sup>27</sup> Ang. Inter Simple Sequence Repeats

mitohondrijskem genomu (Rajendrakumar in sod., 2007). Mikrosatelitske markerje lahko delimo na več načinov, in sicer glede na:

1. število nukleotidov v osnovnem motivu ponovitve (mono-, di-, tri-, tetra-, penta- in heksa-nukleotidi);
2. tip ponovitve osnovnega motiva (Oliviera in sod., 2006):
  - a. popoln mikrosatelit je sestavljen iz enega samega motiva baz, ki se tandemsko ponavlja in ni prekinjen z nobeno drugo bazo, npr. (AG)<sub>6</sub>;
  - b. nepopoln mikrosatelit ima osnovni motiv prekinjen z insercijo dveh baznih parov, ki so različni od osnovnega motiva, npr. (AG)<sub>5</sub>CT(AG)<sub>3</sub>;
  - c. prekinjen mikrosatelit ima osnovni motiv prekinjen z insercijo krajšega zaporedja, ki se razlikuje od osnovnega motiva, npr. (AG)<sub>4</sub>CGTG(AG)<sub>4</sub>;
  - d. sestavljen mikrosatelit sestavlja vsaj dva različna osnovna motiva, npr. (AG)<sub>5</sub>(TC)<sub>4</sub>;
3. lokacijo v genomu (Senan in sod., 2014):
  - a. genomski ali jedrni mikrosateliti izhajajo iz genomske DNA organizma;
  - b. genski mikrosateliti ali markerji EST-SSR izhajajo iz izraženih nukleotidnih zaporedij ESTs ali iz zaporedij znanih genov;
  - c. organelni mikrosateliti, kamor sodijo kloroplastni in mitohondrijski mikrosateliti;
4. dolžino celotnega mikrosatelita (Temnykh in sod., 2001):
  - a. mikrosateliti razreda I so popolni mikrosateliti, daljši od 20 bp in so visoko polimorfni;
  - b. mikrosateliti razreda II so popolni mikrosateliti, dolgi med 12 in 20 bp, ki so večinoma manj variabilni, saj je verjetnost nepravilnega parjenja zdrsnjenih verig zelo majhna.

Evolucija mikrosatelitskega markerja vključuje povečanje ali zmanjšanje števila ponovitev osnovnega motiva in je odvisna od stopnje mutacij (Ellegren 2004; Pearson in sod., 2005). Znano je tudi, da je mutacijska stopnja mikrosatelitov različna, saj naj bi nanjo vplivali število ponovitev in nukleotidno zaporedje osnovnega motiva, dolžina ponavljanjače se enote, DNA zaporedje obrobnih regij, prekinitve v mikrosatelitu, stopnja rekombinacije in transkripcije (Schlötterer, 2000). Med mutacijske mehanizme, ki vplivajo na variabilnost mikrosatelitov, sodijo zdrs enovijačne DNA, rekombinacija dvovijačne DNA (neenako prekrižanje), nepravilno parjenje ali popravljanje dvojnega preloma ter retrotranspozicija. Med podvojevanjem DNA lahko pride do zdrsa polimeraze na matrični verigi, kar povzroči nekomplementarnost matrične in novo sintetizirane verige. Če popravljalni mehanizmi napake zaradi zdrsa ne popravijo, pride pri mikrosatelitu do nastanka ali izgube ene ali več ponovitev (Wang in sod., 2009a). To pomeni, da je stabilnost mikrosatelita odvisna od ravnovesja med zdrsom DNA in med učinkovitostjo popravljalnih mehanizmov na mestih nekomplementarnosti. Nestabilnost mikrosatelita se poveča, ko pride do mutacije ali okvare genov, ki so odgovorni za popravljalni mehanizem. Poškodbe DNA

lahko povzročijo tudi zunanji stresni dejavniki, kot so UV-sevanje,  $\gamma$ -sevanje in oksidativni stres, saj izzovejo zdrs in tako povečajo stopnjo mutacije mikrosatelita. Znano je, da zdrs med podvojevanjem DNA favorizira podaljšanje mikrosatelita, med tem ko lahko točkovne mutacije razcepijo daljši mikrosatelite v dva ali več krajših mikrosatelitov. Tudi medsebojno delovanje zdrsa in rekombinacije lahko vpliva na stabilnost mikrosatelita (Li in sod., 2002). Generiranje mikrosatelitov naj bi bilo odvisno tudi od retrotranspozonov, t.j. ponavljačih se zaporedij DNA, ki nastanejo po reverzni transkripciji katerekoli molekule RNA in se nato vgradijo v kromosome. Parida in sod. (2009) so pri proučevanju mikrosatelitov sladkornega trsa ugotovili, da je bilo 23,1 % mikrosatelitskih zaporedij homolognih z retrotranspozoni. Predlagali so, da bi lahko z retrotranspozoni povezana oz. združena zaporedja SSR morda služila kot potencialen vir za razvoj polimorfnih genetskih markerjev.

Čeprav so mikrosatelitski markerji izjemno popularno orodje, imajo tako svoje prednosti kot pomanjkljivosti. V primerjavi z markerji RFLP, RAPD (He in sod., 2003) in AFLP (Lee in sod., 2004) so bolj variabilni in informativni. Ker metoda mikrosatelitov temelji na verižni reakciji s polimerazo (PCR<sup>28</sup>), zadostuje za analizo že majhna količina tarčne DNA (Kumar in sod., 2009). Poleg tega uporaba daljših začetnih oligonukleotidov in visoke temperature prileganja tekom genotipizacije izboljšajo ponovljivost tehnike SSR in posledično so tudi rezultati zanesljivejši. Možno je tudi hkratno določanje večjega števila mikrosatelitov v eni sami reakciji pomnoževanja (multipleks PCR), kar lahko bistveno zniža stroške, povezane z genomskimi analizami. Mikrosatelitski markerji so najprimernejši za starševske analize in za oceno stopnje sorodnosti med posamezniki ali skupinami, saj jih odlikuje hipervariabilnost in pogostost pojavljanja v genomu, kar omogoča enostavno razlikovanje med genetsko podobnimi posamezniki. Multialelni mikrosateli pa so se izkazali kot najboljši markerski sistem za odkrivanje polimorfizmov med sortami (Stepien in sod., 2007). Mikrosatelitski markerji nudijo tudi širok spekter uporabe pri izdelavi genskih kart in pri primerjalnem kartiraju. Med pomanjkljivosti sodi razvoj markerjev SSR na novo, saj zahteva veliko stroškov in vloženega dela ter časa (Thiel in sod., 2003). Druga pomembna težava, ki je povezana z mikrosateli, je prisotnost ničnih alelov. Potencialni vzrok za njihov nastanek je slabo prileganje začetnih oligonukleotidov, kar je lahko posledica neujemanj v nukleotidnih zaporedjih, slabe kakovosti oz. prenizke koncentracije tarčne DNA (Ellergen, 2004) ali pa je posledica mutacij/indelov na mestih prileganja začetnega oligonukleotida (Pemberton in sod., 1995). To pomeni, da v primeru ničtega alela pri homozigotnem osebku ne dobimo nobenega produkta PCR, heterozigota pa napačno interpretiramo kot homozigoten genotip, kar vodi do zapletov pri določanju frekvenc alelov in genotipov ter do podcenjevanja heterozigotnosti. Dileme o zanesljivosti markerjev SSR se pojavijo tudi pri filogenetskih

---

<sup>28</sup> Ang. Polymerase Chain Reaction

študijah zaradi možne homoplazije, ki pomeni prisotnost vsaj dveh alelov z enako dolžino na istem lokusu, ki imata različen izvor (Estoup in sod., 2002).

Pri razvoju novega seta polimorfnih markerjev SSR za določeno vrsto je potrebno izolirati oz. identificirati mikrosatelitske ponovitve skupaj z informacijo o zaporedju obrobnega območja, da lahko dizajniramo začetne oligonukleotide. Nato je potrebno optimizirati pogoje reakcije pomnoževanja začetnih oligonukleotidov ter jih v nadaljevanju testirati in primerjati na skupini posameznikov, saj lahko le tako ocenimo njihov polimorfni potencial. Kljub pogosti uporabi mikrosatelitskih markerjev na področju rastlinske genetike predstavlja njihov razvoj ozko grlo pri mnogih kmetijskih vrstah, zlasti pri tistih manj donosnih. Poleg tega je frekvenca mikrosatelitov v rastlinskem genomu bistveno manjša kot v živalskem, kar tudi predstavlja oviro pri izolaciji mikrosatelitov v velikem obsegu. Prvi protokol za izolacijo novih mikrosatelitskih markerjev so objavili Rassmann in sod. (1991) in je temeljil na hibridizacijskem preverjanju rekombinantnih klonov ter se je izkazal za finančno in časovno potratnega za tiste vrste z nizko frekvenco mikrosatelitov. Zaradi nenehnega razvoja na področju genomike so v zadnjih letih na voljo nova molekularna orodja in platforme za sekvenciranje, ki omogočajo analizo in proučevanje genomskeh podatkov. Za razvoj novih mikrosatelitskih markerjev so na voljo naslednje metode (Senan in sod., 2014):

1. razvoj mikrosatelitov iz neobogatenih genomskeh knjižnic;
2. razvoj mikrosatelitov iz obogatenih knjižnic, ki temeljijo na povečanju deleža fragmentov DNA z mikrosatelitskimi motivi;
3. razvoj mikrosatelitov s pomočjo amplikonov drugih markerskih sistemov (RAPD, ISSR in AFLP);
4. aplikacija tehnologije NGS;
5. razvoj mikrosatelitov iz zaporedij EST ali kloroplastnih zaporedij, ki so dostopna v javnih podatkovnih bazah;
6. testiranje pomnoževanja markerjev SSR, ki so že bili razviti pri sorodnih vrstah (testiranje prenosljivosti med sorodnimi organizmi).

Mikrosatelitski markerji sodijo med bolj priljubljene markerje, ker omogočajo visoko zmogljivo genotipizacijo in so se izkazali kot izjemni markerski sistem za analizo starševstva, za konstrukcijo genskih kart visoke gostote, za kartiranje uporabnih genov, za selekcijo s pomočjo markerjev (MAS<sup>29</sup>) in za proučevanje genetskih in evolucijskih odnosov (Parida in sod., 2009). Zato ne preseneča, da številni avtorji poročajo o razvoju mikrosatelitskih markerjev tudi pri oljki (Sefc in sod., 2000; Cipriani in sod., 2002; De la Rosa in sod., 2002; Sabino Gil in sod., 2006). Mikrosatelitski markerji so bili pri oljki uporabljeni za genotipizacijo sort, za izdelavo kart genske povezanosti, za starševsko analizo, za filogenetske študije ter za pregledovanje izvora in sledljivosti oljčnega olja

---

<sup>29</sup> Ang. Marker Assisted Selection

(Bracci in sod., 2011). Za boljšo uporabnost markerjev SSR in primerljivost rezultatov med različnimi laboratoriji so bili celo izdelani sezname priporočljivih mikrosatelitskih markerjev in pripadajoči protokoli (Doveri in sod., 2008; Baldoni in sod., 2009).

### 2.2.2 Zbirke izraženih nukleotidnih zaporedij (ESTs)

Transkriptom je nabor vseh molekul informacijske RNA (mRNA) oz. vseh prepisov (transkriptov), ki jih premore ena celica ali populacija celic v določenem trenutku in je odvisen od okoljskih dejavnikov, v nasprotju z genomom, ki je praviloma stalen. Ker so molekule RNA preveč nestabilne, niso primerne za direktno kloniranje, zato jih je potrebno s pomočjo reverzne transkriptaze prepisati v cDNA. Le-to pa lahko kloniramo in razvijemo knjižnico cDNA. Nato se klone cDNA naključno prepiše iz 5' in 3' smeri in rezultat so kratka, od 200 do 800 baz dolga izražena nukleotidna zaporedja ali ESTs.

Leta 1991 so Adams in sod. prvi objavili zaporedja EST, ki so jih izolirali iz človeških možganov. V naslednjih letih so se izboljšale tehnike razvoja cDNA in napredovala je tehnologija določanja nukleotidnega zaporedja, kar je privelo do skokovitega povečanja števila zaporedij EST različnih organizmov, med njimi tudi pri rastlinskih vrstah. V zadnjih desetih letih je prišlo do razvoja visoko zmogljivih metod NGS, ki omogočajo kartiranje in kvantifikacijo transkriptomov. Mednje sodi metoda RNA-Seq<sup>30</sup> ali sekvenciranje RNA (Wang in sod., 2009b), ki je bila prvič objavljena leta 2006 (Bainbridge in sod., 2006) in je kmalu začela izpodrivati mikromreže in zaporedja EST.

Analiza zaporedij EST ne pomeni le učinkovitega pristopa za odkrivanje genov in identifikacijo njihove strukture, temveč omogoča tudi proučevanje tkivno specifičnega izražanja in identifikacijo polimorfnih markerjev, kot so npr. markerji SSR in SNP, ki so primerni za gensko kartiranje, funkcijске študije, anotacijo genomov in za primerjalno genomiko (Rudd, 2003; Ozgenturk in sod., 2010).

Zaradi vse večjega zanimanja za oljko in njene produkte na svetovnem trgu so se zelo povečala prizadevanja za zapolnitve vrzeli na področju funkcijске genomike oljke in od leta 2009 je bilo identificiranih že več tisoč ESTs (Bracci in sod., 2011), ki nastanejo iz izraženih genov v določenih stadijih ali tkivih organizma. V podatkovni bazi NCBI je trenutno shranjenih 12.589 ESTs oljke (NCBI, 2016). Baze EST podatkov so zelo koristno orodje za odkrivanje genov in markerjev, gensko kartiranje in funkcijске študije (Ozgenturk in sod., 2010). V letu 2009 je prišlo do pomembnega napredka v razumevanju transkriptoma oljke, saj so Alagna in sod. (2009) objavili prvo večjo kolekcijo zaporedij EST. Z uporabo tehnologije 454 so primerjali štiri različne knjižnice cDNA dveh oljčnih

---

<sup>30</sup> Ang. RNA-Sequencing

sort ('Coratina' in 'Tendellone') in pridobili informacije o tistih različno izraženih genih, ki so potencialno odgovorni za uravnavanje metabolnih procesov v plodu oljke in za vsebnost fenola v času zorenja plodov. Galla in sod. (2009) so izdelali obsežno zbirkzo izraženih genov za tri razvojne stadije oljčnega plodu sorte 'Leccino', s čimer so na ravni transkriptoma osvetlili metabolne poti ogljikovih hidratov, maščobnih kislin, sekundarnih metabolitov, transkripcijskih faktorjev in hormonov. Kar 3.734 ESTs so objavili Ozgenturk in sod. (2010). Izdelali so dve knjižnici cDNA iz mladih listov in nezrelih plodov oljke s ciljem, da bi odkrili nove gene in njihovo funkcijo v oljki. Zelo obsežno zbirkzo ESTs pa so razvili Muñoz-Mérida in sod. (2013), saj so izdelali 12 knjižnic cDNA iz različnih tkiv (plod, semena, mlada stebla, listi, brsti in korenine) v različnih razvojnih stadijih oljke. K izboljšanju znanja o sestavi genov in njihovem izražanju pri oljki pa je leta 2013 pomembno prispevala tudi slovenska raziskovalna skupina, in sicer z razvojem knjižnice zaporedij EST, ki predstavlja vse razvojne stadije oljčnega plodu sorte 'Itrska belica' (Rešetič in sod., 2013). Pridobila je kar 577.025 zaporedij s povprečno dolžino 241bp in zaporedja so javno dostopna preko NCBI SRA podatkovne baze (SRX215662, 2012). Parra in sod. (2013) so se osredotočili na transkriptom ploda oljke v času popolne zrelosti, objavili 397.457 zaporedij ESTs in nato izdelali primerjalno analizo izražanja genov in regulacije transkripcije v perikarpu popolnoma zrelega oljčnega ploda ter v njegovi abscisijski coni. Potek kontrole abscisije zrelega oljčnega ploda so proučevali tudi Gil-Amado in Gomez-Jimenez (2015) tako, da so izdelali transkriptom abscisijske cone v času celičnih delitev. Predstavili so celovito sliko celičnih odgovorov, ki so pogojeni z izražanjem genov in vodijo v abscisijo zrelega oljčnega ploda.

Številni raziskovalci so proučevali tudi spremicanje izražanja genov v času, ko je oljka izpostavljena stresnim dejavnikom. Pomemben biotski stresor oljke je oljčna muha, zato so Corrado in sod. (2012) prvi izdelali knjižnico cDNA takih oljčnih plodov, v katerih so že bili rovi, ki so jih povzročile ličinke oljčne muhe. Identificirali so 195 zaporedij ESTs in nato analizirali spremenjeno izražanje 20 unikatnih genov, povezanih z obrambno reakcijo napadenega oljčnega ploda. Bazakos in sod. (2012) so želeli na ravni transkriptoma pojasniti, kako se oljka odzove na slanostni stres, zato so v analizo vključili sorto, tolerantno na sol in sorto, občutljivo na sol. V skupno oljčno bazo so prispevali 1.956 ESTs s povprečno dolžino 381 bp. Nato sta dve raziskovalni skupini iz transkriptov oljčnih listov ločeno izdelali obsežni zbirki izraženih genov, ki so povezani z odzivom oljčnih listov na mraz. Leyva-Pérez in sod. (2014) so odkrili 6.309, Guerra in sod. (2015) pa 5.464 unikatnih transkriptov, ki so različno izraženi v obdobju, ko je rastlina izpostavljena nizkim temperaturam. Bazakos in sod. (2015) so razvili 28.270 unikatnih transkriptov oljčnih listov in korenin ter ponovno ugotavljali, kako se oljka odziva na slanostni stres. V koreninah so odkrili 24 in pri listih 70 različno izraženih genov, pri čemer je bila pri določenih genih raven izražanja znižana, pri drugih pa povišana.

V nadaljevanju so se raziskovalci lotili tudi razvoja in proučevanja transkriptoma drugih organov oz. tkiv oljke. Zelo specifičnega proučevanja oljčnih listov so se lotili Koudounas in sod. (2015), saj so prvi izdelali zbirko 7.258 zaporedij ESTs ne-žleznih trihomov, ki so razporejeni predvsem na spodnji listni povrhnjici in imajo pomembno vlogo pri odgovoru na biotske in abioticske stresne dejavnike. Nedavno so Zafra in sod. (2016) objavili transkriptom semena oljke in identificirali široko paleto zaporedij proteina 11S. Nato so med njimi izbrali tiste, ki kodirajo protein legumin (11S globulin), ki je eden temeljnih proteinov, pomembnih za kalitev semena, poleg tega pa naj bi bil celo domnevni povzročitelj alergij pri ljudeh. Kot smo že omenili, so pri oljki še vedno odprta vprašanja glede reproduktivne biologije, zato ne preseneča, da so se Carmona in sod. (2015) lotili razvoja t.i. reproduktivnega transkriptoma oljke ter izdelali osem knjižnic cDNA peloda in pestiča oljke v različnih razvojnih stadijih. Iaria in sod. (2016) pa so pred kratkim analizirali dinamiko transkriptoma pelodnih cevk oljke in sicer za različne kombinacije pelod/pestič, ki so jih zbrali iz samoneoplodnih in samooplodnih sort ter izdelali *de novo* transkriptom. S tem so prispevali k boljšemu poznavanju mehanizmov kalitve peloda in rasti pelodne cevke pri oljki.

### 2.2.3 Genski mikrosatelitski markerji (EST-SSRs)

Številne genetske študije na rastlinah so potrdile, da so markerji SSR ali mikrosateliti zelo uporaben markerski sistem (Schlöterer, 2004). Genski mikrosateliti ali EST-SSRs izhajajo iz izraženih nukleotidnih zaporedij EST in imajo lahko prednost pred genomskimi mikrosateliti, ki nastajajo iz tradicionalnih genomskih knjižnic. Tudi markerji EST-SSR imajo prednosti in slabosti. K nagli identifikaciji markerjev SSR iz zbirk izraženih nukleotidnih zaporedij so pripomogli različni bioinformacijski programi (Varshney in sod., 2005b), kot so TROLL (Castelo in sod., 2002), MISA (Thiel in sod., 2003), SciRoKo (Kofler in sod., 2007), QDD (Meglécz in sod., 2010), in tudi sam razvoj je relativno hiter in cenovno sprejemljiv (Thiel in sod., 2003; Gupta in sod., 2003). Z markerji EST-SSR se odkriva raznolikosti v izraženih regijah genoma in so markerji tarčnih genov. V primerih, ko polimorfizem v ponovitvah motivov vpliva na delovanje gena, v katerem se marker nahaja, predstavlajo markerji EST-SSR t.i. funkcionalne markerje (Andersen in Lübbertseidt, 2003). Njihova morda najpomembnejša lastnost je prenosljivost med sorodno oddaljenimi vrstami, zaradi česar so zelo pomembni za področje primerjalne genomike (Wöhrmann in Weising, 2011). Poleg tega naj bi bili pri markerjih EST-SSR ničti aleli manj verjetni, kot pri tistih markerjih, ki izhajajo iz nekodirajočih regij (Rungis in sod., 2004).

Razvoj markerjev EST-SSR je odvisen od razpoložljivosti zbirk EST in je posledično omejen na ekonomsko pomembne kmetijske rastline, za katere so zaporedja EST na voljo v javno dostopnih podatkovnih bazah (Varshney in sod., 2005b). Za obsežen razvoj

markerjev EST-SSR je omejujoč dejavnik tudi relativno nizka številčnost markerjev SSR v kodirajočih regijah (Katti in sod., 2001). Poleg tega kažejo markerji EST-SSR na splošno nižji polimorfizem v primerjavi z genomskeimi SSR in so lahko zato manj učinkoviti pri razlikovanju zelo sorodnih posameznikov (Gupta in sod., 2003). Možna razloga je, da ti markerji težijo k ohranjanju nukleotidnega zaporedja, ker izhajajo iz kodirajočih regij (Varshney in sod., 2005b). Kljub temu se je pri študiju kivija kar 93,5 % razvitih markerjev izkazalo kot polimorfnih (Fraser in sod., 2004).

Genski mikrosateliti se pri rastlinah nahajajo v približno 5 % zaporedij EST, najpogosteješi so trinukleotidni motivi, sledijo pa jih dinukleotidni ali tetranukleotidni motivi (Rota in sod., 2005). V kodirajočih regijah se pri rastlinah najpogosteje pojavljajo mikrosatelitski motivi (AG)n, (AAG)n in (CCG)n (Grover in sod., 2007; Grover in Sharma, 2007), med tem ko so za nekodirajoče regije DNA značilne dolge ponovitve motiva (AT)n (Grover in sod., 2007). O razvoju in uporabnosti markerjev EST-SSR so poročali že pri različnih sadnih vrstah: malina (Woodhead in sod., 2008), aktinidija (Man in sod., 2011), marelica (Shangguan in sod., 2011), jablana (Celton in sod., 2009), citrusi (Chen in sod., 2006, 2008; Liu in sod., 2013). Markerji EST-SSR so se pri rastlinah izkazali kot zelo primerno orodje za genotipizacijo, odkrivanje genov in markerjev ter za gensko kartiranje (Cloutier in sod., 2012).

Kljub številnim dokumentiranim možnostim uporabe markerjev EST-SSR je pri oljki trenutno na voljo le nekaj takih markerjev, ki so bili predhodno testirani in potrjeni kot polimorfni (Adawy in sod. 2013; De la Rosa in sod., 2013; Essalouh in sod. 2014; Mariotti in sod., 2016). Le 34 markerjev EST-SSR je bilo popolnoma ovrednotenih, zanje pa so objavljeni tudi pari začetnih oligonukleotidov (De la Rosa in sod., 2013; Mariotti in sod., 2016). In prav De la Rosa in sod. (2013) so prvi do sedaj, ki so s širim markerji EST-SSR ugotavljali starševstvo sejančkov, pridobljenih s kontroliranim križanjem. V predhodnih študijah so bili za proučevanje oprševalnih odnosov (Mookerjee in sod., 2005) in za ugotavljanje stopnje samo(ne)kompatibilnosti (Diaz in sod., 2007; Seifi in sod., 2012) pri oljki uporabljeni le genomske markerji SSR.

## 2.3 RAZISKAVE GENOMA OLJKE

Oljka je diploidna rastlinska vrsta ( $2n = 2x = 46$ ), z velikostjo genoma med 2,90 pg/2C in 3,07 pg/2C (1C je od 1,400 do 1,500 Mbp) (Loureiro in sod., 2007). V primerjavi z drugimi kmetijskimi rastlinami je poznavanje genoma oljke precej v zaostanku, saj so šele v 90. letih pričeli določati nukleotidno zaporedje. Prvo zaporedje DNA pri oljki je bilo v podatkovni bazi NCBI objavljeno leta 1994 (Villalba in sod., 1994), vendar so bile v naslednjih letih raziskave na področju genoma oljke bistveno počasnejše kot pri drugih rastlinskih vrstah. Najverjetneje je vedno večje zanimanje za oljko in njene produkte v

svetovnem merilu pripomoglo k napredku na področju genomskega študija oljke (Bracci in sod., 2011).

Za izboljšanje razumevanja funkcije genov pri oljki je bilo največ raziskav osredotočenih v identifikacijo zaporedij EST, in sicer tistih, ki so v glavnem povezana z alergeni peloda in značilnostmi ploda oljke (Bracci in sod., 2011). Znano je, da pelod oljke povzroča respiratorne alergije, zato ne preseneča, da je bilo prvo objavljeno zaporedje DNA leta 1994 tisto, ki kodira alergeni protein. Do sedaj je identificiranih in ovrednotenih 11 različnih alergenov peloda oljke, od Ole e 1 do Ole e 12, pri čemer je izpuščen alergen z oznako Ole e 4, saj naj bi bil razpadni produkt alergena Ole e 9. Poleg teh je poznan še alergen Ole e 13, ki pa je bil identificiran v plodu oljke (Villalba in sod., 2014). Kot glavni alergen peloda oljke velja Ole e 1, za katerega je značilno, da obstaja v številnih različicah, ki naj bi bile pogojene z izvorom oljčne sorte. Polimorfizem v nukleotidnem zaporedju gena Ole e 1 lahko vpliva na strukturo proteina in posledično na variabilnost v alergenosti Ole e 1 (Hamman-Khalifa in sod., 2008).

Zaradi ekonomske pomembnosti oljčnega olja v mnogih državah, še posebej tistih na območju sredozemskega bazena, in koristnih zdravilnih učinkov, ki so povezani z uživanjem oljčnega olja, so bile osrednje raziskave na področju molekularne biologije in biokemije oljke osredotočene na proučevanje regulacije in kontrole biosinteze lipidov in poti kopičenja triacilglicerola (Banilas in Hatzopoulos, 2013). V zadnjem desetletju je opaziti bistven napredek pri izolaciji in karakterizaciji genov, ki so odgovorni za biosintezo maščobnih kislin, vključujuč enoil-ACP reduktazo, steroil-ACP desaturazo, plastidno  $\omega$ -3 desaturazo, citokrom b5, citoplazemsko  $\omega$ -6 desaturazo, citoplazemsko  $\omega$ -3 desaturazo, acil-CoA diacilglicerol aciltransferazo in oleosin (Hatzopoulos in sod., 2002). Številni avtorji so izolirali osrednje gene, ki so vpletjeni v biosintezo maščobnih kislin, modifikacijo in skladiščenje triacilglicerola, ter proučili prostorsko in časovno izražanje teh genov med razvojem oljčnega ploda (Poghosyan in sod., 1999; Banilas in sod., 2005, Hernández in sod., 2005; Poghosyan in sod., 2005; Banilas in sod., 2007, Giannoulia in sod., 2007; Banilas in sod., 2011; Matteucci in sod., 2011). Aroma oljčnega olja je v veliki meri odvisna od aktivnosti in lastnosti ključnih genov oz. encimov v lipoksiogenazni (*LOX*) poti, katerih delovanje se sproži med pridobivanjem oljčnega olja, in sicer zaradi mletja oljčnih plodov in prisotnosti kisika (Morales in sod., 1999). Do danes je pri oljki izoliranih in ovrednotenih pet genov *LOX* (Palmieri-Thiers in sod., 2009; Padilla in sod., 2009; Padilla in sod., 2012; Padilla in sod., 2014). Poleg tega so Padilla in sod. (2010) izolirali tudi gen za hidroperoksid liazo (*HLP*), ki je bil močno izražen v dozorelem mezokarpu in naj bi prav tako prispeval k oblikovanju arome oljčnega olja.

Izoliran je bil tudi gen za monosaharidni transporter (*OeMST2*), katerega izražanje je povečano med zorenjem ploda (Conde in sod., 2007). Do velikega napredka v razumevanju transkriptoma oljke je prišlo leta 2009, saj so bili identificirani geni, ki se

različno izražajo med razvojem ploda oljke (Alagna in sod., 2009, 2012; Galla in sod., 2009; Rešetič in sod., 2013), pri čemer je bila še posebna pozornost namenjena tistim genom, ki so odgovorni za sintezo lipidov in fenolov. Cultrera in sod. (2014) so izolirali in ovrednotili tri gene za acil-prenašalne proteine (*OeACP*) in zaključili, da so proteini ACP najbolj zastopani v plodu oljke, kjer naj bi bili pomembni v sintezi maščobnih kislin za akumulacijo triacilglicerola. Pred kratkim je bila narejena obsežna analiza transkriptov razvijajočega cveta oljke (Alagna in sod., 2016), v okviru katere so bili izbrani kandidatni geni, ki imajo pomembno vlogo v številnih biosinteznih poteh in v specifičnih bioloških procesih, ki vplivajo na reproduktivno biologijo oljke.

Raziskave so bile narejene tudi v zvezi z odzivom oljke na različne okoljske dejavnike. Secchi in sod. (2007) so proučevali vpliv vodnega stresa na nivo izražanja genov, ki so odgovorni za sintezo akvaporinov in ugotovili, da se v primeru sušnega stresa zniža regulacija teh genov. Posledica znižane regulacije genov pa je zmanjšana permeabilnost membrane in s tem znižana izguba vode iz celice. Bazakos in sod. (2015) so razvili transkriptom oljčnih listov in korenin ter proučevali različno izražanje genov, ki so povezani z odzivom rastline na slanostni stres. Med tem so Guerra in sod. (2015) proučevali spremembe transkriptov oljčnih listov, ki nastanejo zaradi nizkih temperatur oz. zmrzali. Poleg sprememb v izražanju genov, ki so splošno značilne pri odgovoru rastlin na nizke temperature, so ugotovili, da se v oljčnih listih inducirajo geni, ki so odgovorni za odstranjevanje kisikovih reaktivnih spojin, vzdrževanje kopičenja ozmolitov, za signalno pot abscizinske kisline ter za spremembo strukture celične stene. Dundar in sod. (2015) pa so izolirali gen za metalotionein (*OeMT2*) in zaključili, da je tudi metalotionein oljke sposoben učinkovito vezati toksične težke kovine in ima zato pomembno vlogo pri homeostazi kovin.

K poznavanju genoma oljke so pomembno prispevali tudi Mariotti in sod. (2010), ker so določili nukleotidno zaporedje kloroplastnega genoma oljke pri sorti 'Frantoio'. Analiza je pokazala, da je organiziranost kloroplastnega genoma in genov pri oljki takšna, kot je ohranjena pri mnogih kritosemenkah (*Angiospermae*). Zanimivo je, da kloroplastni genom oljke ne vsebuje nobenih inverzij, podvojitev genov, insercij ali izgub genov oz. intronov, ki so bile odkrite v kloroplastnem genomu rodu *Jasminum* in *Menodora*, ki prav tako sodita v družino *Olea*. Kloroplastni genom oljke naj bi vseboval 130 genov in 644 ponavljaljajočih se zaporedij, od katerih je bilo 633 mononukleotidnih mikrosatelitov ter šest di-, tri tetra- in dva penta- nukleotidna mikrosatelita. S to raziskavo so bile podane ključne informacije za nadaljnje strukturne, funkcijске in primerjalne genomske študije plastidov oljke. Poleg tega so na novo identificirali 30 kloroplastnih markerjev DNA, ki predstavljajo dragoceno orodje za oceno variabilnosti plastidne DNA med oljčnimi sortami, za analize populacijske genetike in filogenetske študije, za karakterizacijo oljčnih sort ter za ugotavljanje sledljivosti oljčnega olja in drugih produktov iz oljk.

Obsežnejšega proučevanja sestave genoma oljke so se lotili Barghini in sod. (2014), ki so se osredotočili na ponavljače se komponente. V genomu oljke se nahajata dve glavni skupini ponavljačih se zaporedij: tandemske ponovitve in retrotranspozoni. Rezultati analize so pokazali, da naj bi tandemske ponovitve predstavljale zelo velik del genoma oljke, približno 31 % celotnega genoma, kar je bistveno več v primerjavi z drugimi rastlinskimi genomi. Nedavno so Cruz in sod. (2016) določili nukleotidno zaporedje DNA oljčnega drevesa, ki naj bi bilo staro približno 1200 let, in sicer je šlo za sorto 'Farga', ki izvira iz vzhodnega dela Španije. Po združevanju surovih zaporedij DNA so pridobili genom s skupno dolžino 1.31 Gb, kar predstavlja približno 95 % ocenjene celotne dolžine genoma oljke, ki naj bi znašala 1,38 Gb. Avtorji menijo, da bo osnutek genoma oljke lahko pomembno prispeval k naprednejšemu proučevanju evolucije in domestikacije oljke ter k izboljšanju programov žlahtnjenja, kar bo posledično vodilo tudi do formiranja novih oljčnih sort.

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 RASTLINSKI MATERIAL

##### 3.1.1 Vzorčenje oljčnih listov

Za rastlinski material smo izbrali 24 sort oljk ('Arbequina', 'Ascolana tenera', 'Athena', 'Buga', 'Cipressino', 'Coratina', 'Črnilica', 'Frantoio', 'Grignan', 'Itrska belica', 'Itrana', 'Leccino', 'Leccio del Corno', 'Leccione', 'Maurino', 'Moraiolo', 'Nocellara del Belice', 'Oblica', 'Pendolino', 'Picholine', 'Samo', 'Santa Caterina', 'Štorta', 'Zelenjak'). Vzorčenje je potekalo v dveh nacionalnih kolekcijskih nasadih, v Strunjanu in na Purissimi, kjer uspevajo oljčne sorte, zbrane s celotnega pridelovalnega območja v Sloveniji in so tudi morfološko opisane. Liste za izolacijo DNA oljke smo nabrali novembra 2011, in sicer z vseh dreves posamezne sorte, saj smo želeli preveriti tudi pravilnost opisa sadilnih mest v kolekcijah (Preglednica 1). Vse vzorčene sorte, z izjemo sorte 'Leccio del Corno', so v nacionalnih kolekcijskih nasadih zastopane z več drevesi, kar pomeni, da smo nabrali 107 vzorcev oljk.

**Preglednica 1:** Imena sort, njihove oznake, kolekcijski nasad oljk in število analiziranih oljčnih dreves  
**Table 1:** Variety names, their codes, olive collection and number of analysed olive trees

Sorta	Oznaka	Kolekcija	Število analiziranih dreves
Arbequina	A	Strunjan	4
Ascolana tenera	At	Strunjan	6
Athena	Ah	Strunjan	5
Buga	Bu	Strunjan	4
Cipressino	C	Strunjan	5
Coratina	Co	Strunjan	5
Črnilica	Č	Strunjan	3
Frantoio	F	Strunjan	5
Grignan	G	Strunjan	5
Itrska belica	B	Strunjan	5
Itrana	I	Strunjan	2
Leccino	L	Purissima	4
Leccio del Corno	Lc	Strunjan	1
Leccione	Lo	Purissima	5
Maurino	M	Strunjan	5
Moraiolo	Mo	Strunjan	3
Nocellara del Belice	Nb	Strunjan	5
Oblica	O	Purissima	6
Pendolino	P	Purissima	5
Picholine	Pi	Strunjan	5
Samo	S	Strunjan	4
Santa Caterina	Sc	Strunjan	6
Štorta	Š	Strunjan	5
Zelenjak	Z	Strunjan	5

Nasad v Strunjanu je zasebna last g. Danila Markočiča in je bil vzpostavljen leta 1995. Leži na nadmorski višini 26 m ( $S45^{\circ}31'42,95''$ ,  $V13^{\circ}36'57,41''$ ) in v celoti obsega 2,18 ha, od tega kolekcijski del predstavlja 0,3 ha (Slika 6). Gojitvena oblika dreves je kotlasta, medvrstna razdalja pa znaša 5 x 3 m.



**Slika 6:** Kolekcijski nasad oljk v Strunjanu, februar 2012 (foto: N. Baruca, 2013)  
**Figure 6:** Olive collection in Strunjan, February 2012 (photo: N. Baruca, 2013)

Nasad na Purissimi (Slika 7) je nekoliko mlajši, zasajen je bil leta 2004 in je v lasti gospodarske družbe Vinakoper d.o.o. Leži na nadmorski višini 63 m ( $S45^{\circ}34'29,98''$ ,  $V13^{\circ}46'09,30''$ ) in obsega 0,96 ha. Gojitvena oblika dreves je kotlasta in medvrstna razdalja znaša 6 x 5 m.

Kurator obeh kolekcijskih nasadov je Poskusni center za oljkarstvo (PCO, KGZ Nova Gorica), ki izvaja naslednje naloge: (a) spremeljanje rasti in rodnosti, (b) spremeljanje občutljivosti na bolezni, škodljivce in nizke temperature, (c) opisovanje in meritve posameznih sort, (d) spremeljanje časa in intenzivnosti cvetenja ter zorenja.



**Slika 7:** Kolekcijski nasad oljk na Purissimi (Ankaran), oktober 2011

**Figure 7:** Olive collection in Purissima (Ankaran), October 2011

### 3.1.2 Vzorčenje oljčnih plodov

Plodove za izolacijo DNA iz oljčnih embrijev smo nabrali v nacionalnem kolekcijskem nasadu v Strunjanu in v enosortnem nasadu ‘Istrske belice’ v Ospu. Oljčni nasad v Ospu je zasebna last g. Dušana Bandlja in leži na nadmorski višini 60 m (S45°34'38,83", V13°51'09,47"). Gojitvena oblika dreves je kotlasta, medvrstna razdalja pa znaša 7 x 6 m.

Na vsaki lokaciji smo izbrali dve drevesi ‘Istrske belice’ v dobri kondiciji. S posameznega drevesa smo na vsaki strani krošnje (vzhod, zahod, sever, jug) naključno nabrali po 15 plodov, skupno 60 plodov z enega drevesa. Plodove sorte ‘Istrska belica’ smo vzorčili oktobra 2012 in oktobra 2013.

Poleg naključnega vzorčenja oljčnih plodov smo v obeh oljčnih nasadih (Strunjan in Osp) leta 2013 izvedli tudi poskus izolacije cvetov z uporabo oprševalnih vrečk. V vsakem nasadu smo izbrali štiri drevesa ‘Istrske belice’ v primerni kondiciji. Pri posameznem drevesu smo na vsaki strani krošnje (vzhod, zahod, sever, jug) izbrali in označili dva poganjka, skupaj osem poganjkov na drevo. Ko so bila socvetja popolnoma razvita in je cvetni venec spremenjal barvo od zelene do bele (razvojna faza 59 v skladu z BBCH<sup>31</sup>

---

<sup>31</sup> Nem. Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt, Chemische Industrie

skalo, Sanz-Cortés in sod., 2002), cvetovi pa so bili še zaprti (Slika 8), smo prešteli socvetja posameznega poganjka ter vse cvetove na socvetjih.



**Slika 8:** Poganjek s popolnoma razvitimi socvetji, maj 2013

**Figure 8:** Shoot with totally expanded flower cluster, May 2013

Nato smo štiri od osmih označenih poganjkov pokrili s plateno oprševalno vrečko (Slika 9). V Strunjanu smo vrečke namestili 27. maja in v Ospu 28. maja 2013. Oprševalne vrečke smo odstranili 18. junija 2013, ko je glavnina venčnih listov odpadla ali ovenela in so že bili vidni nastavki plodov. Štirideset dni po polnem cvetenju smo na vseh označenih poganjkih prešteli uspešno oplojene cvetove oz. plodove. Po podatkih Poskusnega centra za oljkarstvo je bil v letu 2013 vrh polnega cvetenja za 'Itrsksko belico' 9. junij 2013. Plodove za izolacijo DNA iz oljčnih embrijev smo iz vseh označenih poganjkov pobrali v drugi polovici oktobra 2013.



**Slika 9:** Izolacija poganjkov s platnenimi oprševalnimi vrečkami, maj 2013  
**Figure 9:** Shoots isolation within the linen pollination bags, may 2013

### 3.2 IZOLACIJA DNA IN MERJENJE KONCENTRACIJE

#### 3.2.1 Izolacija DNA iz oljčnih listov

DNA oljke smo izolirali iz mladih oljčnih listov po uveljavljenem protokolu (Kump in sod., 1992).

Postopek izolacije je bil sledeč:

1. V terilnico smo na drobne koščke natrgali približno  $1 \text{ cm}^2$  svežega tkiva in ga ob dodatku 1,5 ml ekstrakcijskega pufra CTAB [2 % (w/v) CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,2 % (w/v)  $\beta$ -merkaptoetanol], ki smo ga predhodno segreli na 68 °C, homogenizirali.
2. Homogenizirane vzorce smo prenesli v 1,5 ml mikrocentrifugirke in jih 1,5 ure inkubirali v vodni kopeli pri 68 °C. Vzorce smo občasno rahlo premešali.
3. Po inkubaciji smo vzorcem dodali 500  $\mu\text{l}$  mešanice fenol-kloroform-izoamil alkohola, pripravljene v razmerju 25:24:1. Vzorce smo dobro premešali in jih 15 min centrifugirali pri maksimalni hitrosti (centrifuga Eppendorf 5430R, Nemčija) in temperaturi 4 °C.

4. Supernatant smo odpipetirali v novo 1,5 ml mikrocentrifugirko in DNA oborili z dodatkom 50 µl 3 M Na-acetata (pH 5,2) in 500 µl ledeno hladnega izopropanola. Vzorce smo premešali in inkubirali 30 min pri –20 °C.
5. Po končani inkubaciji smo vzorce ponovno dobro premešali in jih 15 min centrifugirali pri maksimalni hitrosti in temperaturi 4 °C.
6. Supernatant smo odpipetirali, usedlino DNA sprali s 500 µl 70 % etanola ter vzorce posušili na sobni temperaturi.
7. DNA smo raztopili v 50 µl pufra TE [10mM Tris-HCl (pH 8,0), 1mM EDTA (pH 8,0)] in jo do nadalnjih analiz shranili na 4 °C.

### 3.2.2 Izolacija DNA iz oljčnih embrijev

Za izolacijo DNA iz oljčnih embrijev smo uporabili metodo, ki sta jo objavila Guerin in Sedgley (2007), le da smo pri koraku 4 in 6 podaljšali čas centrifugiranja, pri koraku 5 pa smo podaljšali čas inkubacije v zamrzovalniku.

Postopek izolacije je vključeval naslednje korake:

1. Iz oljčnih plodov smo s skalpelom najprej odstranili mezokarp in nato s pomočjo primeža zlomili endokarp. S skalpelom smo previdno zarezali v endosperm, ga razpolovili in nato embrij s pinceto prenesli v 1,5 ml centrifugirko (Slika 10).
2. Tkivo smo homogenizirali v 1,5 ml centrifugirki s pomočjo plastičnega pestila in ob dodatku 500 µl ekstracijskega pufra (100 mM TRIS-HCl, pH 8,0, 20 mM EDTA, pH 8,0 in 4 mg/ml natrijeve soli dietil ditiokarbaminske kisline, ki smo jo dodali tik pred uporabo). Tako pripravljen homogenizat smo prenesli v 2 ml centrifugirko in ga shranili na led, dokler nismo pripravili vseh vzorcev.
3. Vzorce smo 10 min inkubirali v vodni kopeli pri 65 °C, jim nato dodali 500 µl lizirajočega pufra [100 mM TRIS-HCl (pH 8,0), 20 mM EDTA (pH 8,0), 1 M NaCl, 2 % SDS in 1 % natrijev metabisulfit, ki smo ga dodali tik pred uporabo] ter jih ponovno 30 min inkubirali v vodni kopeli pri 65 °C. Pri tem drugem koraku smo centrifugirke vsakih 10 min premešali.
4. Centrifugirke smo nato prenesli na led in vzorcem dodali 1 ml mešanice fenol-kloroform-izoamil alkohola, pripravljene v razmerju 25:24:1. Vzorce smo dobro premešali in jih 20 min centrifugirali pri maksimalni hitrosti (centrifuga Eppendorf 5430R, Nemčija) in temperaturi 4 °C.
5. Supernatant smo odpipetirali v novo 1,5 ml mikrocentrifugirko in DNA oborili z dodatkom 500 µl ledeno hladnega izopropanola. Vzorce smo premešali in inkubirali 1 uro in 30 min pri –20 °C.
6. Po končani inkubaciji smo vzorce ponovno dobro premešali in jih 15 min centrifugirali pri maksimalni hitrosti in temperaturi 4 °C.

7. Supernatant smo odpipetirali, usedlino DNA sprali z 1 ml 76 % etanola ter vzorce posušili na sobni temperaturi.
8. DNA smo raztopili v 30 µl pufra TE [10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)] in jo do nadalnjih analiz shranili na 4 °C.



**Slika 10:** Prvi korak pri izolaciji DNA iz oljčnih embrijev, januar 2013  
**Figure 10:** The first step during DNA extraction from olive embryo, january 2013

### 3.2.3 Merjenje koncentracije DNA

Koncentracijo DNA vseh vzorcev smo izmerili s pomočjo fluorimetra Qubit™ (Invitrogen, ZDA) in kompleta za merjenje koncentracije Quant® dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, ZDA).

Postopek merjenja koncentracije:

1. Najprej smo pripravili delovno raztopino tako, da smo reagent (Quant® dsDNA BR Reagent) redčili s pufrom (Quant® dsDNA BR Buffer) v razmerju 1:200.
2. Po 190 µl delovne raztopine smo odpipetirali v merilni centrifugirki (Quant® assay tubes) za standarda. V eno centrifugirko smo dodali 10 µl standarda 1 (Quant® dsDNA BR Standard #1), ki ne vsebuje DNA, v drugo centrifugirko pa 10 µl standarda 2 (Quant® dsDNA BR #2), ki vsebuje 100 ng/µl DNA. Nato smo

pripravili še vzorce tako, da smo v Qubit merilno centrifugirko odpipetirali 199 µl delovne raztopine in dodali po 1 µl izolirane DNA. Vzorce smo rahlo premešali, počakali približno 3 min in nato pričeli z merjenjem koncentracije.

3. Na fluorimetru smo s pritiskom na tipko »HOME« izbrali program Quant-iT dsDNA BR in v program vstopili s tipko »GO«. Fluorimeter smo najprej umerili s standardoma 1 in 2, nato pa izmerili koncentracijo DNA naših vzorcev v µg/ml.

### 3.3 RAZVOJ IN KARAKTERIZACIJA MARKERJEV EST-SSR

#### 3.3.1 Identifikacija markerjev EST-SSR in razvoj začetnih oligonukleotidov

Markerje EST-SSR smo identificirali iz zbirke izraženih nukleotidnih zaporedij EST, ki jo je v okviru nacionalnega projekta razvila slovenska raziskovalna skupina (Rešetič in sod., 2013). S pomočjo Roche 454 tehnologije sekvenciranja naslednje generacije so pridobili 577,025 zaporedij EST razvijajočega plodu oljke sorte ‘Itrska belica’, s povprečno dolžino 241 bp. Z uporabo zbirnika iAssembler (Zheng in sod., 2011) so dobljena zaporedja na osnovi podobnosti združili v domnevna konsenzna zaporedja in pridobili 98,924 zaporedij. Vsa zaporedja EST so zainteresiranim uporabnikom na voljo na spletu preko NCBI SRA arhiva zbirke NCBI (SRX215662, 2012). Konsenzna zaporedja so shranjena pri DDBJ/EMBL/GenBank pod akcesijsko številko GDUL00000000 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/GDUL00000000>). Le eno samo konsenzno zaporedje (KU709832) je na voljo v nukleotidni podatkovni zbirki NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)).

98,924 združenih zaporedij smo uporabili kot vir za identifikacijo in lokalizacijo mikrosatelitskih markerjev s pomočjo orodja MISA<sup>32</sup> (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa>), s katerim lahko identificiramo popolne in sestavljeni mikrosateliti, kjer so osnovni motivi prekinjeni z določenim številom baz. Pri identifikaciji mikrosatelitskih markerjev smo definirali parameter minimalno število ponovitev osnovnega motiva. Za dinukleotidne mikrosatelite smo opredelili minimalno osem ponovitev osnovnega motiva ter za trinukleotide in tetranukleotide minimalno šest ponovitev osnovnega motiva. Za mikrosatelite, z osnovnim motivom sestavljenim iz petih (pentanukleotidi) ali več nukleotidov, pa smo določili minimalno štiri ponovitve osnovnega motiva. Vsa zložena zaporedja EST (kontigi ali soseske), ki so vsebovala mikrosatelite (EST-SSR), daljše od 20 nukleotidov, smo nato pregledali s pomočjo pregledovalnika Tablet (angl. next generation sequence assembly viewer) (Milne in sod., 2010). V tem koraku smo iz nadaljnje analize izločili vsa tista zaporedja EST, ki niso bila primerna za dizajniranje parov začetnih oligonukleotidov iz naslednjih razlogov: (a) ker je bilo zaporedje DNA

---

<sup>32</sup> Ang. Perl script MIcroSATellite

obrobnih območij mikrosatelita zelo kratko (manj kot 30 baz) ali (b) ker je mikrosatelit ležal točno na mestu prekrivanja zaporedij EST znotraj kontiga oz. so bila zaporedja zložena skupaj ravno na osnovi komplementarnosti mikrosatelitskega zaporedja. Sledila je primerjava izbranih zaporedij EST-SSR z ne-redundantno (NR) proteinsko bazo NCBI<sup>33</sup>, z uporabo algoritma BlastX ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)). Vsa zaporedja EST-SSR, ki so imela zadetek v ne-redundantni proteinski bazi, smo v nadaljevanju uporabili za razvoj parov začetnih oligonukleotidov. Izbrana zaporedja EST-SSR smo iz programa MISA, z informacijo o poziciji mikrosatelita in intronskih mestih, določenih s pomočjo PERL script P3\_IN in P3\_OUT, usmerili k programu Primer3 4.0.0 (Koressaar in Remm, 2007; Untergrasser in sod., 2012) za izdelavo parov začetnih oligonukleotidov. Uporabili smo privzete kriterije programa Primer3. Definirali smo le parameter razpon dolžine produkta, in sicer od 150 do 220 bp. Razviti pari začetnih oligonukleotidov so bili komercialno sintetizirani s pomočjo Integrated DNA Technologies (IDT). Po en začetni oligonukleotid vsakega para je bil podaljšan za M13 (-21) univerzalni začetni oligonukleotid dolžine 18 bp (5'-TGTAAAACGACGCCAGT-3') za varčno fluorescentno označevanje (Schuelke, 2000). Tako zasnovani začetni oligonukleotidi lahko namreč občutno zmanjšajo stroške genotipizacije.

### 3.3.2 Optimizacija pomnoževanja razvitih markerjev EST-SSR

Pomnoževanje vseh 110 razvitih zaporedij EST-SSR v verižni reakciji s polimerazo (PCR) je bilo optimizirano na skupini osmih oljčnih sort ('Itrska belica', 'Buga', 'Črnica', 'Štorta', 'Leccino', 'Pendolino', 'Frantoio', 'Ascolana tenera'). Za vsak razvit par začetnih oligonukleotidov smo eksperimentalno določili optimalno temperaturo prileganja  $T_a$ <sup>34</sup>. Pri lokusih, kjer je bilo pomnoževanje slabše, smo povečali količino DNA ter število ciklov v drugi stopnji pomnoževanja. Optimalna reakcija PCR je potekala v skupnem volumnu 15 µl in je vsebovala: 1× PCR reakcijski pufer (Fermentas/Thermo Scientific, ZDA) [750 mM Tris-HCl (pH 8,8 na 25 °C); 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,1 % (v/v) Tween 20], 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas/Thermo Scientific, ZDA), 0,2 mM dNTP (Sigma-ALDRICH, ZDA), 0,2 µM koncentracijo vsakega začetnega oligonukleotida, 0,25 µM koncentracijo univerzalnega M13 (-21) začetnega oligonukleotida, označenega s fluorescentno molekulo 6-FAM, VIC, PET ali NED (Applied Biosystems, ZDA), 0,375 enote encima *Taq* DNA polimeraze (Fermentas/Thermo Scientific, ZDA) in 40 ng oljčne DNA.

---

<sup>33</sup> Ang. National Center for Biotechnology Information

<sup>34</sup> Ang. Annealing temperature

Pomnoževanje je potekalo v dveh cikličnih termostatih, v Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, ZDA) in v PTC-0200 DNA Engine® Thermal Cycler (Bio-Rad, ZDA), po naslednjem dvostopenjskem temperaturnem profilu:

- začetna 5 minutna denaturacija DNA pri 94 °C,
- sledilo je 5 ciklov s ponavljanjem:
  - a) 45 sekund pri 94 °C,
  - b) 30 sekund pri začetni temperaturi prileganja  $T_{a1}$  (Preglednica 3),
  - c) 1 minuta in 30 sekund pri 72 °C,kjer se je pri vsakem ciklu začetna temperatura prileganja  $T_{a1}$  znižala za 1 °C,
- sledilo je 35 ciklov s ponavljanjem:
  - a) 30 sekund pri 94 °C,
  - b) 30 sekund pri temperaturi prileganja  $T_{a2}$  (Preglednica 3),
  - c) 1 minuta in 30 sekund pri 72 °C,
- končna inkubacija vzorcev 10 minut pri 72 °C.

Po končani reakciji PCR smo na 96-mestno ABI mikrotitrsko ploščo za sekvenator najprej odpipetirali po 1 µl pomnoženih vzorcev ter nato vsakemu dodali 0,3 µl velikostnega standarda GeneScanTM -500 LIZ® (Applied Biosystems, ZDA) in 10,7 µl formamida (Hi-Di Formamide, Applied Biosystems, ZDA). Ploščo smo prekrili s septo in jo kratko centrifugirali. Sledila je 5 min denaturacija na 95 °C. Po končani denaturaciji smo ploščo takoj prenesli v ledeni blok in jo za 10 min shranili v zamrzovalnik. Nato smo ploščo namestili v avtomatski sekvenator ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, ZDA), ki nam je služil za ločevanje in detekcijo pomnoženih markerjev. Podatke analize smo uvozili v programske paket Gene Mapper 4.1 (Applied Biosystems, ZDA), s pomočjo katerega smo pridobili podatke o prisotnosti in dolzinah alelov ter o jakosti fluorescentnega signala. Vsak genski marker je bil potrjen ločeno, saj je kakovost in robustnost pomnoženih produktov ključna za molekulske analize, še posebej pa za karakterizacijo genskih virov.

### 3.4 POTRDITEV NOVIH MARKERJEV EST-SSR S SEKVENČNO REAKCIJO

Za potrditev mikrosatelitskih motivov novih markerjev EST-SSR, smo uporabili uveljavljeno Sangerjevo metodo določevanja nukleotidnih zaporedij (Sanger in sod., 1977). Metoda temelji na cikličnem sekvenciranju s termostabilno polimerazo in fluorescentno obarvanimi dideoksi nukleotidi (ddNTP), pri čemer ima vsak ddNTP (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP) na 3' koncu vezano drugačno fluorescentno barvilo. Ko se v novo nastajajočo verigo DNA namesto dioksi nukleotida (dNTP) vgradi ddNTP, se sinteza verige DNA ustavi, ker ddNTP na 3' koncu nima vezane hidroksilne skupine. Rezultat sekvenčne reakcije je zmes različno dolgih fragmentov (vse možne dolžine pomnoževanega odseka), kjer se vsak konča z enim od fluorescentno označenih ddNTP-jev.

### 3.4.1 Pomnoževanje novih markerjev EST-SSR v reakciji PCR

Za potrditev mikrosatelitskih motivov smo pri vsakem od 46 novih markerjev EST-SSR izbrali tiste sorte, ki so bile na posameznem lokusu homozigotne. Nato smo z izbranimi homozigotnimi vzorci ponovno naredili reakcijo PCR. Za vsak vzorec smo naredili dve ločeni reakciji PCR, eno v smeri vodilnega začetnega oligonukleotida (F)<sup>35</sup> in drugo v smeri povratnega začetnega oligonukleotida (R)<sup>36</sup>. Reakcija pomnoževanja je potekala v skupnem volumnu 15 µl in je vsebovala vse komponente, ki so opisane v poglavju 3.3.2, razen fluorescentnih začetnih oligonukleotidov. Pomnoževanje je potekalo v dveh cikličnih termostatih, v Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, ZDA) in v PTC-0200 DNA Engine® Thermal Cycler (Bio-Rad, ZDA), prav tako po dvostopenjskem temperaturnem profilu, ki je opisan v poglavju 3.3.2.

Na koncu smo vzorce ohladili na 4 °C in jih do nadaljnjih analiz shranili v hladilnik (4 °C).

### 3.4.2 Čiščenje produktov reakcije PCR

Čiščenje produktov reakcije PCR temelji na encimski razgradnji neporabljenih začetnih oligonukleotidov in deoksinukleotid trifosfatov. Uporabili smo encim alkalna fosfataza, ki katalizira odstranitev fosfatne skupine s 5' in 3' konca molekule DNA ter encim eksonukleaze I, ki pri eno verižni DNA odstranjuje nukleotide v smeri od 3' proti 5' koncu. Torej ta dva encima razgradita nevgrajene nukleotide in začetne oligonukleotide.

Reakcija neposrednega čiščenja je potekala v skupnem volumnu 7 µl in je vsebovala 5 µl produkta reakcije PCR, 2 enoti eksonukleaze I (Exonuclease I 20U/µl, EN0581, Fermentas/Thermo Scientific, ZDA), 0,5 enote alkalne fosfataze (FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase, 1U/µl, EF0654, Fermentas/Thermo Scientific, ZDA) in 1,4 µl 1× PCR pufra (10× PCR pufer z (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Fermentas/Thermo Scientific, ZDA).

Reakcija je potekala v cikličnem termostatu Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, ZDA), po naslednjem temperaturnem profilu:

- 45 min inkubacija pri 37 °C, za razgradnjo začetnih oligonukleotidov in deoksinukleotid trifosfatov,
- 15 min inkubacija pri 80 °C, za inaktivacijo termostabilnih encimov.

Na koncu smo vzorce ohladili na 4 °C in nadaljevali s sekvenčno reakcijo.

---

<sup>35</sup> Ang. Forward primer

<sup>36</sup> Ang. Reverse primer

### 3.4.3 Sekvenčna reakcija

Sledilo je določevanje nukleotidnega zaporedja. Za vsak vzorec DNA sta bili narejeni dve sekvenčni reakciji, ena v smeri vodilnega začetnega oligonukleotida in druga v smeri povratnega začetnega oligonukleotida. Sekvenčna reakcija je potekala v skupnem volumnu 10 µl in je vključevala 3,5 µl očiščene DNA, 0,2 µl za produkt PCR specifičnega začetnega oligonukleotida (F ali R), 0,5 µl BigDye Terminator 3.1 Ready Reaction Mix (Applied Biosystems, ZDA), 2,0 µl 5× pufra za sekvenciranje (5× Sequencing Buffer, Applied Biosystems, ZDA) in 3,8 µl vode.

Sekvenčna reakcija je potekala v cikličnem termostatu Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, ZDA), po sledečem temperaturnem profilu:

- začetna 3 min denaturacija pri 96 °C
- sledilo je 50 ciklov s ponavljanjem:
  - d) 10 sekund pri 96 °C,
  - e) 10 sekund pri 50 °C,
  - f) 4 minute pri 60 °C,
- končna 7 minutna inkubacija vzorcev pri 72 °C.

Na koncu smo vzorce ohladili na 4 °C in jih shranili pri -20 °C.

### 3.4.4 Čiščenje produktov sekvenčne reakcije

V tem koraku smo odstranili nevgrajene, s fluorescentnimi barvili označene, dideoksi nukleotide in s tem pripomogli k bolj čistemu signalu pri kapilarni elektroforezi. Pred pričetkom čiščenja smo produkte sekvenčne reakcije (10 µl) prenesli na 96-mestno ABI mikrotitrsko ploščo za sekvenator.

Čiščenje sekvenčne reakcije z etanolom in EDTA je potekalo po naslednjih korakih:

- 1) Po prenosu vzorcev na ploščo smo ploščo za kratek čas centrifugirali.
- 2) Vsakemu vzorcu smo dodali 2,5 µl 125 mM EDTA (pH 8,0) ter ploščo ponovno za kratek čas centrifugirali.
- 3) Nato smo vzorcem dodali 30 µl absolutnega etanola, ploščo prekrili s septo in jo ovili z aluminijasto folijo ter premešali tako, da smo ploščo 5-10 krat obrnili.
- 4) Sledila je 15 minutna inkubacija na sobni temperaturi in ob zaščiti pred svetlobo.
- 5) Po končani inkubaciji smo odstranili aluminijasto folijo in ploščo centrifugirali 55 min pri maksimalni hitrosti in 4 °C.
- 6) Po centrifugiranju smo s plošče odstranili še septo in s hitrim gibom navzdol iz plošče izlili etanol in EDTA.

- 7) Ploščo smo obrnili navzdol in jo namestili na papirnato brisačo ter tako 2 min centrifugirali pri  $190 \times g$ .
- 8) Nato smo ploščo ponovno ovili v aluminijasto folijo in jo 5 min inkubirali na sobni temperaturi.
- 9) Na koncu smo DNA raztopili v 12  $\mu l$  formamide (Hi-Di Formamide, Applied Biosystems, ZDA).

Tako pripravljeno ploščo smo prekrili s septo in jo namestili v avtomatski sekvenator ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, ZDA), s pomočjo katerega je bilo izvedeno sekvenciranje vzorcev.

### **3.4.5 Obdelava rezultatov sekvenciranja**

Po končanem sekvenciranju smo s pomočjo računalniškega programa Sequencing Analysis 5.4 (Applied Biosystems, ZDA) dobljene rezultate najprej pretvorili v obliko kromatogramskih datotek tipa »ab1«. Sledila je obdelava rezultatov z računalniškim programom CodonCode Aligner 3.7.1 (CodonCode Corporation, Massachusetts, ZDA), ki omogoča urejanje in poravnavo zaporedij. V program smo prenesli rezultate sekvenciranja, shranjene v obliki datoteke tipa »ab1«. Nato smo z uporabo ukaza »Izreži konce«<sup>37</sup> odstranili manj kakovostne končne dele zaporedij in jih nato še ročno pregledali ter odrezali morebitne slabše obrobne regije. Pri vsakem analiziranem vzorcu sta bili rezultat sekvenčne reakcije dve zaporedji, eno v smeri vodilnega in drugo v smeri povratnega začetnega oligonukleotida, ki smo ju s pomočjo programa CodonCode Alligner sestavili v konsenzno zaporedje.

V nadaljevanju smo uporabili računalniški program Mega7<sup>38</sup> (Kumar in sod., 2016), v katerem smo s pomočjo algoritma ClustalW (Thompson sin sod., 1994) za vsak posamezen lokus poravnali konsenzna zaporedja sekvenciranih alelov in originalno zaporedje EST ‘Istrske belice’. Vsa poravnana zaporedja smo ročno pregledali, jih odrezali do mest prileganja začetnih oligonukleotidov in preverili, če je prišlo do pomnoževanja pričakovanega mikrosatelitskega motiva. Nato smo si po posameznih lokusih za vsak sekvenciran alel zabeležili število ponovitev osnovnega mikrosatelitskega motiva, prisotnost mutacij na mestu prileganja začetnih oligonukleotidov in indel mutacij v obrobnih regijah mikrosatelita.

---

<sup>37</sup> Ang. Clip Ends

<sup>38</sup> Ang. Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets

### 3.5 ANALIZA MIKROSATELITSKIH SEKVENC TRANSKRIPTOMA OLJKE

Vsa zaporedja EST, v katerih smo identificirali mikrosatelite, smo vključili tudi v funkcijsko analizo z uporabo programskega paketa Blast2GO (Conesa in sod., 2005).

Funkcijska anotacija je vključevala naslednje korake:

- 1) Skupino zaporedij EST, v katerih smo identificirali mikrosatelitske markerje, smo pripravili v FASTA formatu in jih nato uvozili v programski paket Blast2GO.
- 2) Sledilo je BLAST iskanje v NCBI neredundantni bazi podatkov, s pomočjo privzetih parametrov modula BLASTX (E-value  $\leq 1.0 \times 10^{-5}$ ).
- 3) Mapiranje<sup>39</sup> je korak, v katerem se je vsem pridobljenim zadetkom BLAST pripisalo t.i. GO<sup>40</sup> tērmine.
- 4) Anotacija<sup>41</sup>: izbiranje najprimernejših GO tēminov iz niza GO tēminov, dobljenih z mapiranjem za posamezno zaporedje EST.
- 5) Vizualizacija rezultatov.

S pomočjo programskega paketa Blast2GO in podatkovne baze »KEGG pathway«<sup>42</sup> smo poiskali tista zaporedja EST, ki kodirajo encime, vključene v metabolne in biosintezne poti (Kanehisa in Goto, 2000).

Pri vseh 46 razvitih markerjih EST-SSR smo določili tudi položaj mikrosatelitskega motiva znotraj gena: (a) lega mikrosatelite v kodirajočem delu zaporedja (CDS)<sup>43</sup>, (b) lega mikrosatelite v 3' nekodirajoči regiji (3' UTR)<sup>44</sup> ali (c) lega mikrosatelite v 5' nekodirajoči regiji (5' UTR)<sup>45</sup>.

### 3.6 PRIMERJAVA NOVIH MARKERJEV EST-SSR Z GENOMSKIMI MIKROSATELITI OLJKE

#### 3.6.1 Pomnoževanje genomskeh mikrosatelitov oljke

Nove genske markerje EST-SSR smo primerjali z genomske mikrosatelite oljke. Za primerjavo smo uporabili 15 parov začetnih oligonukleotidov, ki so jih iz genomske DNA razvile različne raziskovalne skupine: ssrOeUA-DCA3, ssrOeUA-DCA5, ssrOeUA-DCA7, ssrOeUA-DCA9, ssrOeUA-DCA11, ssrOeUA-DCA14,

---

<sup>39</sup> Ang. Mapping

<sup>40</sup> Ang. Gene Ontology

<sup>41</sup> Ang. Annotation

<sup>42</sup> Zbirka ročno narisanih presnovnih poti

<sup>43</sup> Ang. Coding sequence

<sup>44</sup> Ang. 3' untranslated region

<sup>45</sup> Ang. 5' untranslated region

ssrOeUA-DCA15, ssrOeUA-DCA16, ssrOeUA-DCA18 (Sefc in sod., 2000), UDO99-019 (Cipriani in sod., 2002), EMO03, EMO90 (De la Rosa in sod., 2002) ter GAPU71B, GAPU101 in GAPU103A (Carriero in sod., 2002).

Za analizo smo uporabili 24 sort oljk in DNA izolirali iz oljčnih listov, kot je opisano v poglavju 3.2.

Reakcija PCR je potekala v skupnem volumnu 15 µl in je bila sestavljena iz 1× PCR reakcijskega pufra (Fermentas/Thermo Scientific, ZDA), 0,2 mM dNTP (Sigma-ALDRICH, ZDA), 0,2 µM koncentracije vsakega začetnega oligonukleotida, 0,25 µM koncentracije univerzalnega M13 (-21) začetnega oligonukleotida, označenega s fluorescentno molekulo 6-FAM, VIC, PET ali NED (Applied Biosystems, ZDA), 0,375 enote encima *Taq* DNA polimeraze (Fermentas/Thermo Scientific, ZDA) in 20 ng oljčne DNA. Pomnoževanje je potekalo v dveh cikličnih termostatih, v Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, ZDA) in v PTC-0200 DNA Engine® Thermal Cycler (Bio-Rad, ZDA), po naslednjem dvostopenjskem temperaturnem profilu:

- začetna 5 minutna denaturacija DNA pri 94 °C,
- sledilo je 5 ciklov s ponavljanjem:
  - a) 45 sekund pri 94 °C,
  - b) 30 sekund pri 57 °C,
  - c) 1 minuta in 30 sekund pri 72 °C,kjer se je pri vsakem ciklu temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov znižala za 1 °C (od 57 °C do 53 °C)
- sledilo je 30 ciklov s ponavljanjem:
  - d) 30 sekund pri 94 °C,
  - e) 30 sekund pri 52 °C,
  - f) 1 minuta in 30 sekund pri 72 °C,
- končna inkubacija vzorcev 10 minut pri 72 °C.

Za ločevanje pomnoženih markerjev smo uporabili avtomatski sekvenator ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, ZDA) in podatke analize uvozili v programske paket Gene Mapper 4.1 (Applied Biosystems, ZDA), kot je opisano v poglavju 3.3.2.

### **3.6.2 Izračun parametrov za karakterizacijo novih markerjev EST-SSR in genomskeih mikrosatelitov oljke**

Uporabili smo različne parametre variabilnosti, razlikovanja in informativnosti, ki opredeljujejo lastnosti novih markerjev EST-SSR in genomskeih mikrosatelitov oljke. Na podlagi rezultatov genotipizacije 24 sort oljk s 46 novimi markerji EST-SSR in 15 markerji SSR, smo za oba markerska sistema oblikovali ločeni preglednici o dolžinah

alelov. Preglednici sta nam služili kot vhodni datoteki za programe, s katerimi smo analizirali in obdelovali rezultate. Za vse analizirane lokuse obeh markerskih sistemov smo določili ali izračunali naslednje statistične parametre:

- a) dejanska heterozigotnost ( $H_o$ ) predstavlja delež posameznikov v populaciji (vzorcu), ki so heterozigotni na posameznem lokusu:

$$H_o = \frac{\text{število heterozigotnih posameznikov}}{\text{število posameznikov v populaciji}} \quad \dots (1)$$

- b) pričakovana heterozigotnost ( $H_e$ ) (Nei, 1987) predstavlja delež posameznikov, ki bi bili heterozigotni v primeru, da bi med posamezniki prišlo do naključnega križanja:

$$H_e = 1 - \left( \sum_{i=1}^n p_i^2 \right) \quad \dots (2)$$

$p_i$  je frekvenca  $i$ -tega alela in  $n$  število alelov na lokusu

- c) število pomnoženih alelov na lokus (n)
- d) število efektivnih alelov na lokus ( $n_e$ ) (Morgante in sod., 1994) se od dejanskega števila alelov na lokus ( $n$ ) razlikuje po tem, da vključuje tudi frekvenco posameznih alelov:

$$n_e = \left( \sum_{i=1}^n p_i^2 \right) \quad \dots (3)$$

$p_i$  je frekvenca  $i$ -tega alela in  $n$  število alelov na lokusu

- e) verjetnost enakosti genotipov (PI<sup>46</sup>) (Paetkau in sod., 1995) predstavlja verjetnost, da imata na proučevanem lokusu dva naključno izbrana posameznika enak genotip:

$$PI = \sum_{i=1}^n p_i^4 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j>1}^n (2p_i p_j)^2 \quad \dots (4)$$

$p_i$  in  $p_j$  sta frekvenci  $i$ -tega in  $j$ -tega alela ter  $n$  število alelov na lokusu

- f) informacijska vrednost polimorfizma (PIC<sup>47</sup>) (Botstein in sod., 1980) predstavlja informativnost posameznega mikrosatelitskega lokusa oz. vrednost, pri kateri z

---

<sup>46</sup> Ang. Probability of identity

<sup>47</sup> Ang. Polymorphic information content

mikrosatelitskim lokusom nedvoumno določimo identiteto posameznika in jo uporabljamo kot merilo primernosti lokusa za gensko kartiranje:

$$PIC = 1 - \left( \sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2 \quad \dots (5)$$

$p_i$  in  $p_j$  sta frekvenci  $i$ -tega in  $j$ -tega alela,  $n$  pa število alelov na lokus

S pomočjo računalniškega programa CERVUS 3.0.7 (Kalinowski in sod., 2007) smo izračunali parametre  $H_o$ ,  $H_e$  in PIC ter določili število alelov na posameznem lokusu. Računalniški program IDENTITY 1.0 (Wagner in Sefc, 1999) smo uporabili za izračun parametra PI. Število efektivnih alelov smo izračunali v Excelovi preglednici. S pomočjo računalniškega programa POPGENE 1.32 (Yeh in sod., 1997) smo določili še število opaženih genotipov ter število vseh možnih genotipov na posameznem lokusu.

### **3.6.3 Primerjava genskih in genomskeh mikrosatelitov pri proučevanju sorodnostnih odnosov oljčnih sort in pri upravljanju kolekcij oljk**

Nove markerje EST-SSR in genomske markerje SSR smo testirali in primerjali glede njihove uporabnosti pri proučevanju sorodnostnih odnosov oljčnih sort, ki uspevajo v Sloveniji ter pri upravljanju nacionalnih kolekcij oljk. Z računalniškim programom POPGENE 1.32 (Yeh in sod., 1997) smo testirali, ali so aleli v Hardy-Weinbergovem ravnovesju, kar pomeni, da sta dejanska in pričakovana heterozigotnost pri posameznem lokusu enaki. S pomočjo algoritma, ki ga je razvil Levene (1949), so bile izračunane pričakovane frekvence genotipov v primeru naključnega parjenja. Nato smo za vsak lokus še s hi kvadrat testom ( $\chi^2$ ) preverili statistično značilnost opaženih frekvenc genotipov v primerjavi s pričakovanimi vrednostmi po Hardy-Weinbergovem načelu. Odstopanje od Hardy-Weinbergovega ravnovesja je lahko posledica ničnih alelov, zato smo s pomočjo računalniškega programa CERVUS 3.0.7 (Kalinowski in sod., 2007) izračunali še frekvenco ničnih alelov za posamezen lokus ( $F(null)$ )<sup>48</sup>.

S programom MICROSAT (Minch, 1997) smo določili sortno specifične alele. S pomočjo programske skripte AMaCAID (Caroli in sod., 2011), ki je napisana v R-okolju, smo izbrali minimalno število markerjev, potrebnih za razlikovanje vseh različnih genotipov v našem vzorcu. Uporabili smo Model3, ki ga je priporočljivo uporabiti takrat, kadar analiziramo več kot 25 molekulskih markerjev ter kot končno število določili 50,000 kombinacij (Caroli in sod., 2011).

---

<sup>48</sup> Ang. Estimated frequency of null alleles

Iz podatkov prisotnosti (1) ali odsotnosti (0) določenega alela pri posamezni sorti smo, s pomočjo računalniškega programa ALS-binary (Prasanth in Chandra, 1997), sestavili binarno matriko in jo uporabili kot osnovo za izračunavanje Jaccardovih koeficientov podobnosti. Jaccardov koeficient meri delež skupnih pomnoženih fragmentov in je definiran kot:

$$J = \frac{w}{w + x + y} \quad \dots (6)$$

kjer je w število parov 1-1 (oba genotipa imata prisoten fragment), x je število parov 1-0 (pri prvem genotipu je fragment prisoten, pri drugem odsoten), y pa število parov 0-1 (pri prvem genotipu je fragment odsoten, pri drugem prisoten). Vrednosti izračunanih Jaccardovih koeficientov podobnosti so med 0 (genotipa nimata nobenega skupnega fragmenta) in 1 (genotipa imata prisotne identične fragmente, zato sta identična). Matriko Jaccardovih koeficientov smo v nadaljevanju uporabili za izračun genetskih razdalj med posameznimi oljčnimi sortami ter za razvrstitev vzorcev v sorodnostne skupine z metodo UPGMA<sup>49</sup> (metoda aritmetičnega povprečja neutežnih parov). Metoda izračuna oddaljenost med skupinama kot aritmetično povprečje vseh medskupinskih oddaljenosti. Za izračunavanje smo uporabili računalniška programa SIMQUAL in SAHN iz paketa NTSYS 2.02 (Rohlf, 1998).

Primernost uporabljene metode smo preverili z izračunom kofenetičnih vrednosti sorodnostnih skupin, ki smo jih primerjali z vrednostmi Jaccardovih koeficientov v osnovni matriki. Za merjenje stopnje ujemanja med matrikama smo izračunali korelacijski koeficient (**r**), testiran z Mantelovo statistiko (**Z**) (Rohlf, 1998). Mantelova statistika temelji na naslednji enačbi:

$$Z_{XY} = X^*Y = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^I x_{ij}y_{ij} \quad \dots (7)$$

pri čemer so  $x_{ij}$  in  $y_{ij}$  elementi matrik x in y. Če kažeta matriki veliko ujemanje, je Z večji od pričakovanega. Test primerja vrednosti Z s permutacijsko distribucijo. To je distribucija, ki jo dobimo, če primerjamo npr. matriko x z vsemi možnimi matrikami, v katere je bila permutirana y. Ker je v praksi to število preveliko, se uporabi le naključne permutacije. Za izračunavanje smo uporabili računalniška programa COPH in MXCOMP iz paketa NTSYS 2.02.

---

<sup>49</sup> Ang. Unweighted Pair Group Method

Stopnjo ujemanja med matrikama lahko (subjektivno) interpretiramo glede na vrednost r (Rohlf, 1998):

- $r=0,9$  zelo dobro ujemanje
- $0,8=r<0,9$  dobro ujemanje
- $0,7=r<0,8$  slabo ujemanje
- $r<0,7$  zelo slabo ujemanje

### 3.7 IZDELAVA STARŠEVSKEGA TESTA Z MARKERJI EST-SSR IN DOLOČITEV NAJPOGOSTEJŠIH OPRAŠEVALNIH SORT ‘ISTRSKIE BELICE’

Za izdelavo starševskega testa in določitev najpogostejših opraševalnih sort ‘Istrske belice’ smo v raziskavo vključili dva oljčna nasada, enosortni nasad ‘Itrske belice’ v Ospu ter kolekcijski nasad v Strunjanu, kjer je zastopanih več potencialnih opraševalnih sort. Za ugotavljanje potencialnih donorjev peloda naključno vzorčenih embrijev smo uporabili sedem visoko polimorfnih markerjev EST-SSR (OeUP-05, OeUP-09, OeUP-16, OeUP-21, OeUP-22, OeUP-37, OeUP-42). Reakcija pomnoževanja embrijev z markerji EST-SSR, njihovo ločevanje in detekcija so opisani v poglavju 3.3.2.

Na podlagi rezultatov genotipizacije vseh uspešno pomnoženih embrijev s sedmimi novimi markerji EST-SSR smo določili ali izračunali naslednje statistične parametre: dejansko heterozigotnost ( $H_o$ ), pričakovano heterozigotnost ( $H_e$ ), število pomnoženih alelov na lokus (n) ter število efektivnih alelov na lokus ( $n_e$ ) (formule in uporabljeni računalniški programi so opisani v poglavju 3.3.3). Rezultate genotipizacije embrijev smo nato primerjali z rezultati genotipizacije 24 oljčnih sort z istimi sedmimi markerji EST-SSR in izdelali starševski test. Za čim bolj optimalne rezultate starševskega testa smo uporabili več računalniških programov:

- a) **FAMOZ** (<http://www.pierroton.inra.fr/genetics/lab/Software/Famoz/index.html>) (Gerber in sod., 2003). Pripravili smo tekstovno vhodno datoteko, ki je vsebovala podatke o frekvencah alelov potencialnih staršev in njihove genotipe, genotipe vseh analiziranih embrijev ter definirali, da je med potencialnimi starši poznana mama, t.j. ‘Itrska belica’. Nato smo s pomočjo programa FAMOZ najprej izračunali vrednosti LOD<sup>50</sup> (skupni logaritem razmerja verjetij). Pri tem razmerju gre za primerjavo verjetnosti, da je posameznik starš danega potomca in z verjetnostjo, da ta dva posameznika nista v sorodu. Računalniški program FAMOZ na podlagi genotipov potomcev, mame in potencialnih očetov izračuna logaritem razmerja verjetij za vsako potencialno sorodstveno zvezo (Gerber in sod., 2003; Seifi in sod, 2012). Kot najverjetnejšo opraševalno sorto smo upoštevali tisti genotip z najvišjo vrednostjo LOD, ki je morala biti hkrati tudi višja od t.i. mejne vrednosti LOD

---

<sup>50</sup> Ang. Log of the odds ratio or likelihood ratio

(Gerber in sod., 2003). Za določitev mejne vrednosti LOD in posledično najpogostejšega donorja peloda smo naredili simulacijo z 10,000 potomci, generiranimi na podlagi znanih starševskih genotipov in frekvenc alelov. Ker se lahko pri vrednotenju pomnoženih alelov pojavijo napake, smo tako v primeru simulacije, kot tudi pri določanju najverjetnejšega očeta oz. potencialnega donorja peloda, predpostavili stopnjo napake 0,01.

Na podlagi rezultatov genotipizacije s sedmimi markerji EST-SSR smo za 24 oljčnih sort s pomočjo programa FAMOZ izračunali tudi verjetnost izključitve EP<sup>51</sup> napačnega potencialnega donorja peloda (Jamieson in Taylor, 1997). Verjetnost izključitve se lahko opredeli kot povprečno sposobnost markerskega sistema, da izključi katero koli dano razmerje. To pa je pogojeno z genotipi sorodnikov, s frekvencami alelov na lokusih in s številom neodvisno testiranih lokusov (Sandberg, 1994, cit. po Jamieson in Taylor, 1997). S programom FAMOZ je mogoče izračunati tri različne verjetnosti izključitve: (1) prva se nanaša na primerjavo posameznega starša s potomcem brez kakršnih koli informacij o drugem staršu; (2) druga zadeva primerjavo para potencialnih staršev s potomcem in (3) tretja, najpogosteje uporabljena, se nanaša na očetovstvo. V tem primeru se par mama-potomec primerja s potencialnim očetom (Gerber in sod., 2000) in to smo uporabili tudi v naši analizi:

$$EP = \sum_i^n p_i(1-p)^2 \sum_{i>j=1}^n (P_i P_j)^2 [4 - 3(p_i + p_j)] \quad \dots (8)$$

$p_i$  in  $p_j$  sta frekvenci  $i$ -tega in  $j$ -tega alela,  $n$  pa število alelov na lokus (Jamieson in Taylor, 1997).

- b) **CERVUS 3.0.7** ([http://www.fieldgenetics.com/pages/aboutCervus\\_New.jsp](http://www.fieldgenetics.com/pages/aboutCervus_New.jsp)) (Kalinowski in sod., 2007). Na podlagi genotipov potencialnih staršev in vseh analiziranih embrijev, shranjenih v tekstovni datoteki, je računalniški program CERVUS izračunal frekvence alelov. Sledila je simulacija za določitev mejne vrednosti LOD pri strogi (95 %) stopnji zaupanja. Pri simulaciji smo definirali število ciklov (10,000), število starševskih kandidatov (24), odstotek vzorčenih starševskih kandidatov (0,40) in stopnjo napake (0,01). Za starševski test smo pripravili tekstovno vhodno datoteko, ki je vsebovala oznake embrijev, poznano mamo in imena potencialnih donorjev peloda ter datoteko z genotipi vseh potencialnih staršev in embrijev. Na koncu smo na podlagi rezultatov simulacije kot najpogostejše oprševalne sorte določili genotipe, ki so imeli vrednost LOD višjo od mejne vrednosti, določene pri 95 % stopnji zaupanja.

---

<sup>51</sup> Ang. Exclusion probability

- c) **PARENTE 1.2** (<http://www2.ujf-grenoble.fr/leca/membres/manel.html>) (Cercueil in sod., 2002). Pripravili smo tekstovno vhodno datoteko, ki je vsebovala podatke o genotipih potencialnih opaševalnih oljčnih sort, genotipe vseh analiziranih embrijev ter podatek o poznani mami, t.j. 'Istrski belici'. Računalniški program PARENTE je za vsak lokus najprej izračunal frekvence alelov. Sledila je določitev najpogostejših donorjev peloda za vsak analiziran embrij. Program je določil verjetnost za vsako posamezno trojico (mati, oče, potomec), in sicer na podlagi izračunanih frekvenc alelov ter stopnje napake (0,01). Zaradi različnih napak, kot so napake pri vrednotenju alelov, mutacije ali ničti aleli, lahko med starši in potomci pride do neujemanja nekaterih alelov. Z upoštevanjem tovrstnih napak smo preprečili nepravilno izključevanje potencialnih donorjev peloda. Kot najpogostejše opaševalne sorte smo upoštevali genotipe z največjo verjetnostjo.

Poleg izdelave starševskega testa z markerji EST-SSR smo izvedli še poskus izolacije cvetov z bombažnimi opaševalnimi vrečkami. Tik pred fiziološko zrelostjo cvetov smo na posameznem drevesu štiri poganjke izolirali z opaševalnimi vrečkami in nato zabeležili število samooplojenih plodov znotraj opaševalnih vreč ter število plodov na odprtih poganjkih. Iz dobljenih rezultatov smo nato izračunali indeks samonekompatibilnosti (ISI<sup>52</sup>), ki je definiran kot razmerje med številom samooplojenih plodov in številom plodov, ki so rezultat odprtega opaševanja (Zapata in Arroyo, 1978). Če je razmerje (a) manjše od 0,2, je sorta samonekompatibilna, (b) med 0,2 in 1, je sorta delno samonekompatibilna in (c) enako ali višje od 1, je sorta samokompatibilna.

Pri plodovih, ki so se razvili v opaševalnih vrečkah, smo samooploditev potrdili še s sedmimi markerji EST-SSR (OeUP-05, OeUP-09, OeUP-16, OeUP-21, OeUP-22, OeUP-37, OeUP-42). Pomnoževanje samooplojenih embrijev z markerji EST-SSR ter njihovo ločevanje in detekcija so opisani v poglavju 3.3.2. Sledila je primerjava rezultatov genotipizacije samooplojenih embrijev z genetskim profilom 'Itrske belice'.

### 3.8 ANALIZA VREMENSKIH RAZMER V LETIH 2012 IN 2013

Za analizo vremenskih razmer smo uporabili podatke bližnjih meteoroloških postaj. V Ospu je v proučevanem oljčnem nasadu nameščena avtomatska meteorološka postaja iMetos (Pessl Instruments GmbH., Avstrija), ki je opremljena s senzorji za merjenje osnovnih parametrov: temperature zraka, zračne vlažnosti in padavin. V Strunjanu je v neposredni bližini nasada postavljena le padavinska meteorološka postaja Agencije RS za okolje (ARSO). Po mnenju strokovnjaka z ARSO je mikroklima v Strunjanu in Portorožu

---

<sup>52</sup> Ang. Index of self-incompatibility

zelo podobna zaradi bližine in vpliva morja. Zato smo za lokacijo Strunjan uporabili tudi podatke s samodejne meteorološke postaje na letališču Portorož, ki nam jih je posredoval ARSO.

Iz vseh meteoroloških postaj smo za leti 2012 in 2013 zbrali dnevne podatke o maksimalni temperaturi zraka ( $^{\circ}\text{C}$ ) in količini padavin (mm). Oljka cveti spomladi. V naših podnebnih razmerah običajno v drugi polovici maja oz. v začetku junija, odvisno od vremenskih razmer v rastni sezoni. Poleg tega ima na začetek in dolžino cvetenja velik vpliv temperatura zraka pred cvetenjem, in sicer približno dva meseca pred cvetenjem (Rallo in Cuevas, 2010). Zato smo za nadaljnjo analizo meteoroloških podatkov za obe proučevani lokaciji izbrali podatke za obdobje od meseca marca do vključno meseca julija, ko naj bi se pri oljki zaključilo tudi trebljenje plodov. Pri oljki velja, da lahko tvori tudi partenokarpne plodove, ki se razvijejo brez oploditve in običajno odpadejo v šestih tednih po začetku cvetenja (Sancin, 1990; Rapoport, 2010), kar časovno sovpada z drugo polovico julija.

S statističnim testom smo primerjali meteorološke podatke (maksimalna temperatura zraka ( $^{\circ}\text{C}$ ), količina padavin (mm)) med letoma 2012 in 2013 na posamezni proučevani lokaciji in med lokacijama v posameznem proučevanem letu. Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili Mann-Whitneyev U test in analize opravili s statističnim programom IBM SPSS Statistics 21.0 (IBM Corp, 2012). Statistično značilne razlike smo sprejeli pri meji zaupanja  $p<0,05$ . Za grafičen prikaz rezultatov smo uporabili okvirje z ročaji<sup>53</sup>.

---

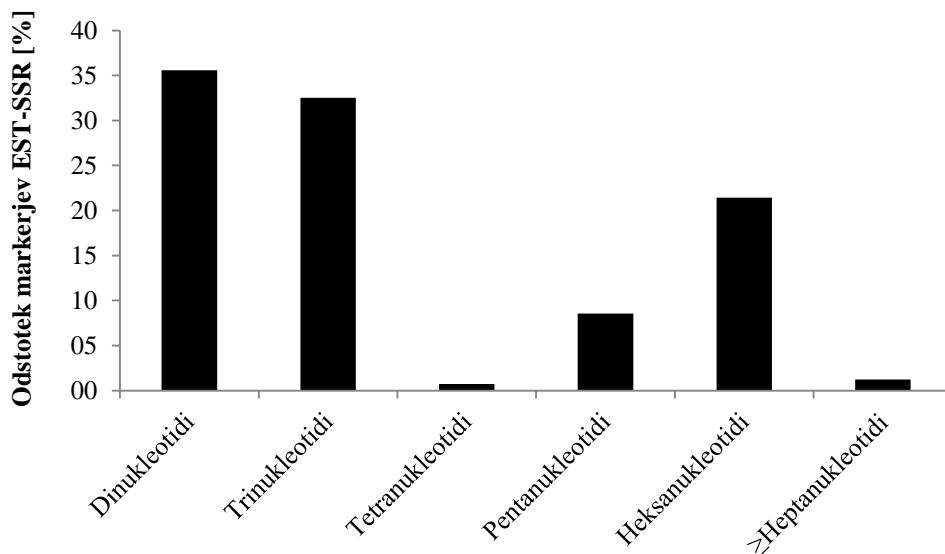
<sup>53</sup> Ang. whiskers box plots

## 4 REZULTATI

### 4.1 RAZVOJ IN KARAKTERIZACIJA MARKERJEV EST-SSR

#### 4.1.1 Identifikacija markerjev EST-SSR in razvoj začetnih oligonukleotidov

V zbirki 98.924 zaporedij EST (36,8 Mb) oljke (SRX215662, 2012; Rešetič in sod., 2013) smo s pomočjo orodja MISA identificirali zaporedja, ki so vsebovala mikrosatelite. Od 98.924 zaporedij EST smo mikrosatelite odkrili v 923 zaporedjih, in sicer skupno 984 mikrosatelitev. V analiziranih zaporedjih EST oljke se je na 37,4 kb nahajal povprečno en mikrosatellit. Med vsemi 923 zaporedji EST, v katerih smo identificirali mikrosatelite, je bilo 874 (94,7 %) takih zaporedij, ki so vsebovala samo en mikrosatelitski lokus, medtem ko je 49 (5,3 %) zaporedij EST vsebovalo več kot eno mikrosatelitsko zaporedje. Poleg tega je bilo kar 3,5 % (34) vseh identificiranih mikrosatelitskih lokusov v obliki sestavljenih mikrosatelitev.



**Slika 11:** Pogostost posameznih dolžin mikrosatelitskih motivov pri zaporedjih EST-SSR oljke  
**Figure 11:** Frequency distribution of different microsatellite repeat units in the olive EST-SSRs

Za vsa identificirana zaporedja EST-SSR oljke smo izračunali pogostost pojavljanja različnih dolžin mikrosatelitskih motivov (Slika 11). Največ je bilo dinukleotidnih ponovitev (35,57 %), ki so jim sledile trinukleotidne (32,52 %), heksanukleotidne (21,44 %) in pentanukleotidne (8,54 %) ponovitve. V preglednici 2 smo prikazali odstotek posameznih identificiranih motivov EST-SSR oljke. Med dinukleotidi so prevladovali motivi GA/TC s 36,9 % ter AG/CT in AC/GT s 30,0 % oz. 17,1 %. Najbolj pogost trinukleotidni motiv je bil GAA/TTC (15,6 %), sledila sta mu še motiv AGA/TCT z 11,6 % in AAG/CTT z 10,6 %.

**Preglednica 2:** Odstotek identificiranih motivov EST-SSR oljke  
**Table 2:** Frequency of identified EST-SSR motifs in olive

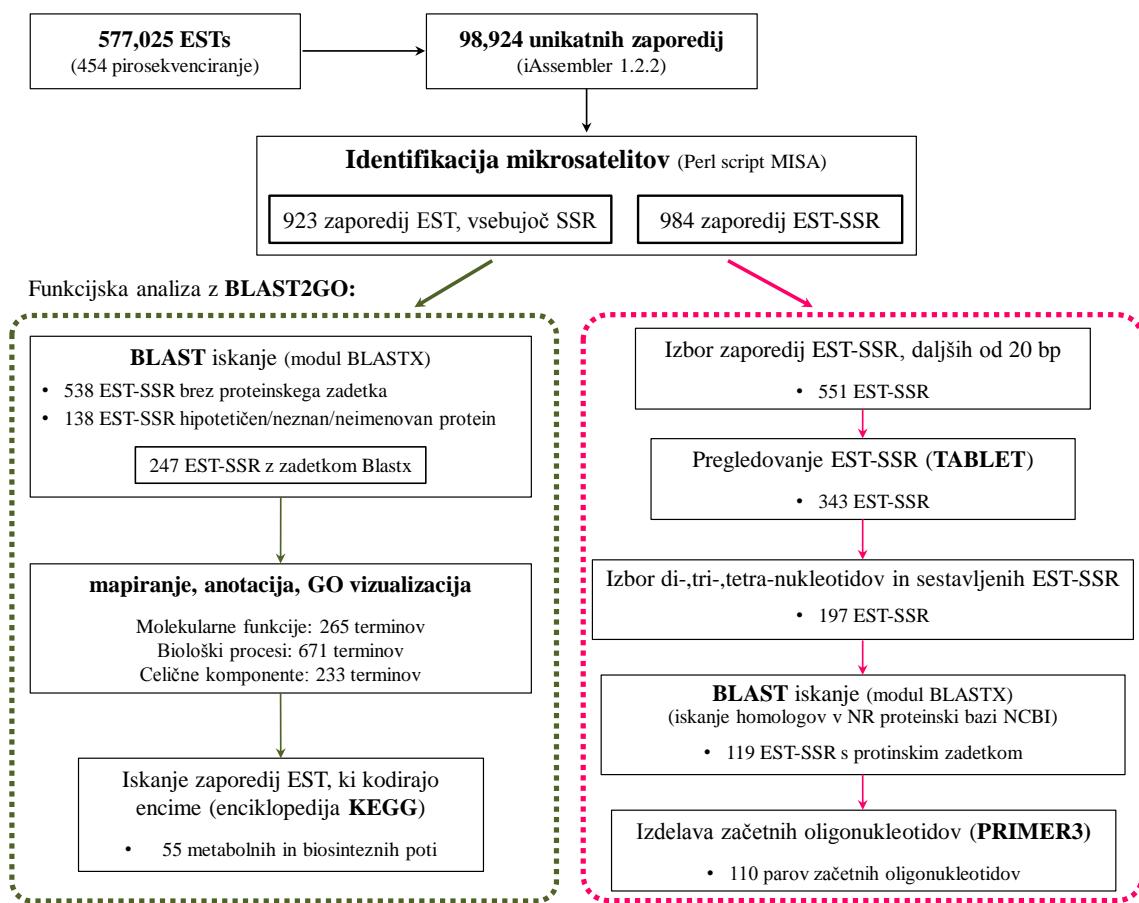
Motiv EST-SSR	Št. ponovitev								Skupaj	%
	4	5	6	7	8	9	10	>10		
<b>Dinukleotidi (350)</b>										
GA/TC	-	-	-	-	34	31	24	36	125	12,70
AG/CT	-	-	-	-	28	24	20	36	108	10,98
AC/GT	-	-	-	-	25	7	7	21	60	6,10
CA/TG	-	-	-	-	20	9	8	9	46	4,67
Drugi	-	-	-	-	8	2	0	1	11	1,12
<b>Trinukleotidi (320)</b>										
GAA/TTC	-	-	25	13	5	3	1	3	50	5,08
AGA/TCT	-	-	12	12	6	2	1	4	37	3,76
AAG/CTT	-	-	21	7	5	0	0	1	34	3,46
TGA/TCA	-	-	12	5	5	2	0	0	24	2,44
ATC/GAT	-	-	3	7	6	1	0	0	17	1,73
CAG/CTG	-	-	9	4	2	0	0	1	16	1,63
AAT/ATT	-	-	7	6	1	0	0	0	14	1,42
TAAT/TTA	-	-	9	1	1	0	1	0	12	1,22
TAT/ATA	-	-	6	2	1	1	1	0	11	1,12
GAG/CTC	-	-	9	0	1	0	0	0	10	1,02
Drugi	-	-	46	26	10	6	3	4	95	9,65
<b>Tetranukleotidi (7)</b>										
TATG/CATA	-	-	0	1	0	0	0	0	1	0,10
TGTA/TACA	-	-	1	0	0	0	0	0	1	0,10
GAAG/CTTC	-	-	1	0	0	0	0	0	1	0,10
Drugi	-	-	0	0	1	1	0	2	4	0,41
<b>Pantanukleotidi (84)</b>										
TTTTC/GAAAA	5	3	1	1	0	0	0	0	10	1,02
AAAAT/ATTTT	8	0	0	0	0	0	0	0	8	0,81
AATGG/CCATT	2	1	0	1	0	0	0	0	4	0,41
CCTTT/AAAGG	3	0	0	0	0	0	0	0	3	0,30
CGTCT/AGACG	3	0	0	0	0	0	0	0	3	0,30
TATTT/AAATA	2	0	2	0	0	0	0	0	3	0,30
Drugi	39	9	4	1	0	0	0	0	53	5,39

Se nadaljuje.

**Nadaljevanje preglednice 2:** Odstotek identificiranih motivov EST-SSR oljke  
**Continuing table 2:** Frequency of identified EST-SSR motifs in olive

Motiv EST-SSR	Št. ponovitev								Skupaj	%
	4	5	6	7	8	9	10	>10		
Heksanukleotidi (211)										
GAGGAA/TTCCTC	7	0	0	0	0	0	0	0	7	0,71
TCTTCA/TGAAGA	7	0	0	0	0	0	0	0	7	0,71
AAAAAT/ATTTTT	5	1	0	0	0	0	0	0	6	0,61
TCCTCT/AGAGGA	4	1	0	0	0	0	0	0	5	0,51
TGCTAC/GTAGCA	0	4	0	0	0	0	0	0	4	0,41
CAGCCA/TGGCTG	3	1	0	0	0	0	0	0	4	0,41
GAAGAG/CTCTTC	3	1	0	0	0	0	0	0	4	0,41
Drugi	109	46	10	4	2	2	1	0	174	17,68
≥Heptanukleotidi (12)	9	1	1	0	0	1	0	0	12	1,22
<b>Skupaj</b>	<b>209</b>	<b>68</b>	<b>178</b>	<b>91</b>	<b>161</b>	<b>92</b>	<b>67</b>	<b>118</b>	<b>984</b>	
<b>%</b>	<b>21,2</b>	<b>6,91</b>	<b>18,09</b>	<b>9,25</b>	<b>16,36</b>	<b>9,35</b>	<b>6,81</b>	<b>11,99</b>		

Sledila je izbira zaporedij EST-SSR, primernih za razvoj začetnih oligonukleotidov (Slika 12). Izmed 984 identificiranih zaporedij EST-SSR smo izbrali tiste, daljše od 20 bp. Takih je bilo 551 zaporedij EST-SSR in smo jih nato pregledali s pomočjo pregledovalnika Tablet (Milne in sod., 2010). Po pregledovanju zaporedij EST smo pridobili 343 zaporedij EST-SSR, ki so imeli obrobno območje mikrosatelita daljše od 30 bp in niso bili locirani na mestu prekrivanja zaporedij EST znotraj kontiga. Izmed teh smo nato izbrali dinukleotide, trinukleotide, tetranukleotide in sestavljeni mikrosatelite, ki jih je bilo le 197, in smo jih v nadaljevanju primerjali z ne-redundantno (NR) proteinsko bazo NCBI. V ne-redundantni proteinski bazi je imelo zadetek 119 zaporedij EST-SSR in nazadnje smo s pomočjo programa Primer3 za 110 zaporedij EST-SSR izdelali pare začetnih oligonukleotidov.



**Slika 12:** Identifikacija in izbira ter funkcijска анализа vseh zaporedij EST-SSR  
**Figure 12:** Identification, selection and functional analysis of all SSR-containing ESTs

#### 4.1.2 Karakterizacija novih markerjev EST-SSR

Vseh 110 izbranih zaporedij EST-SSR smo testirali glede primernosti za genotipizacijo na skupini osmih oljčnih sort. Od vseh 110 razvitih začetnih oligonukleotidov je bil samo en lokus EST-SSR monomorfen (0,9 %) ter 46 (41,8 %) polimorfnih, z dvema ali več odkritimi aleli, ki smo jih uspešno objavili (Baruca Arbeiter in sod., 2017). Preostalih 63 (57,3 %) parov začetnih oligonukleotidov se ni izkazalo kot primernih za genotipizacijo. Zato smo jih na podlagi odkritih signalov v procesu genotipizacije, po vzoru avtorja Chen in sod. (2014), razvrstili v naslednje skupine: (1) brez signala (44,6 %), (2) šibek signal (10,9 %) in (3) mnogovrstni signali (1,8 %). Iz preglednice 3 je razvidno, da med 46 novimi markerji EST-SSR prevladujejo trinukleotidi (67,4 %) in sledijo jim dinukleotidi (26,1 %). Poleg tri- in di-nukleotidov smo odkrili le še dva tetranukleotida in en sestavljen mikrosatelit. V preglednici 3 je za vsak marker EST-SSR navedena številka akcije, ime lokusa, nukleotidno zaporedje parov začetnih oligonukleotidov, mikrosatelitska ponovitev, lega mikrosatelita, temperatura prileganja, razpon dolžine alelov ter identificiran domnevni protein. Opise domnevnih proteinov smo zaradi nedvoumnosti navedli v originalnem jeziku.

**Preglednica 3:** Seznam na novo razvitih markerjev EST-SSR oljke  
**Table 3:** List of newly developed EST-SSR primer pairs in olive

Akcesijska številka	Lokus	Nukleotidno zaporedje parov začetnih oligonukleotidov (5'-3')	Mikrosatelitska ponovitev	Lega mikrosatelite	T <sub>a1</sub> , T <sub>a2</sub> (°C)	Razpon dolžine alelov (bp)	Domnevna funkcija; akcesijska številka
GDUL01003735	OeUP-01	F: TGTCTCATGCCAGATAAACAG R: *GCAGCAATCCCACAACTAA	(AAG)11	5' UTR	55, 50	200-221	aquaporin-like protein [Petunia x hybrida]; AAL49750.1
GDUL01018604	OeUP-02	F: *TTTGTGCGCTTGCAGATTCCC R: CTCCCTTACCAAGTTGTCGGA	(TGC)7	CDS	50, 45	197-255	ribosomal lysine N-methyltransferase 3 isoform X2 [Sesamum indicum]; XP_011076932.1
GDUL01058010	OeUP-03	F: *TCATACGGGCTAGTCGATCG R: ATCTGCGCTAGTAACACAT	(TC)13(AC)8	3' UTR	50, 45	166-170	pre-mRNA cleavage factor Im 25 kDa subunit 2-like [Sesamum indicum]; XP_011084411.1
GDUL01030423	OeUP-04	F: *TCCGAAATCCCAGTAGAGTTT R: GCAGCAGAAATCACCAATCCT	(TCT)7	5' UTR	50, 45	196-232	uncharacterized protein LOC104247946 [Nicotiana sylvestris]; XP_009802414.1
GDUL01046188	OeUP-05	F: GGCACCAAAGCTAACAGCTAA R: *CCCGGGAAAAGTGTCTGT	(CAG)8	CDS	58, 53	186-201	ethylene-responsive transcription factor ERF113 isoform X2 [Sesamum indicum]; XP_011086885.1
GDUL01026627	OeUP-06	F: *TGAAGTTCCAAGCAGTCCAA R: CTCTTTCTTCAACAGTGGCTGA	(TTC)11	CDS	50, 45	141-163	cyclin-D3-2-like [Nicotiana sylvestris]; XP_009769846.1
GDUL01021889	OeUP-07	F: *TATTGATCACACGGGAATCG R: AACACAATCCAATCCAAGCTG	(GA)11	3' UTR	50, 45	207-235	phosphatidylinositol transporter, putative [Ricinus communis]; XP_002512943.1
GDUL01011676	OeUP-08	F: *AACGCTCAAGTTCGGTGTT R: CCAATCCGGTGGCATGATG	(TGC)7	3' UTR	50, 45	196-208	mediator of RNA polymerase II transcription subunit 8 [Fragaria vesca subsp. vesca]; XP_004296540.1

Se nadaljuje.

**Nadaljevanje preglednice 3:** Seznam na novo razvitih markerjev EST-SSR oljke  
**Continuing table 3:** List of newly developed EST-SSR primer pairs in olive

Akcesijska številka	Lokus	Nukleotidno zaporedje parov začetnih oligonukleotidov (5'-3')	Mikrosatelitska ponovitev	Lega mikrosatelite	T <sub>a1</sub> , T <sub>a2</sub> (°C)	Razpon dolžine alelov (bp)	Domnevna funkcija; akcesijska številka
GDUL01009850	OeUP-09	F: *TGCTTAGAGCCAGAGGACGA R: CCCAAAATCCATTTCACACCA	(TGA)8	CDS	58, 53	141-156	hypothetical protein M569_16005, partial [Genlisea aurea]; EPS58808.1
GDUL01002589	OeUP-10	F: *ACCGGAGCTGAGAATATCCA R: TCTTCCACTGCCACTACTCG	(TCG)7	CDS	58, 53	212-218	zinc finger CCCH domain-containing protein 11-like [Sesamum indicum]; XP_011077389.1
GDUL01041395	OeUP-11	F: *ATAGTAACCACCAGCGCCAT R: GTGATTGTCATTAAATTGCATCA	(TGG)7	3' UTR	53, 48	137-165	abscisic stress-ripening protein 3-like isoform X1 [Populus euphratica]; XP_011044239.1
GDUL01003880	OeUP-12	F: *GAGCTGCTGGATAGGACTG R: CTCGATCCCTCACGTTACAAG	(TGTA)6	3' UTR	50, 45	140-151	proteasome-associated protein ECM29 homolog isoform X2 [Cucumis melo]; XP_008449628.1
GDUL01008284	OeUP-13	F: *CAATAACCCCATCAGCAGCC R: AGTCATTAAACCTTGCAGTCA	(TATG)7	3' UTR	53, 48	162-174	DDB1- and CUL4-associated factor 8 [Sesamum indicum]; XP_011089371.1
GDUL01006921	OeUP-14	F: *TTCCCTTCGCTGAAGGTA R: GTGTGGATGGCGCTTAGTC	(AC)11	5' UTR	55, 50	153-165	predicted protein [Phaeodactylum tricornutum CCAP 1055/1]; XP_002185470.1
GDUL01000672	OeUP-15	F: *TCTGGGTTGCTAATTGTAG R: TTTCCTTCATCATAAAGCTT	(GTG)7	3' UTR	58, 53	184-190	enhancer of mRNA-decapping protein 4-like [Nelumbo nucifera]; XP_010279236.1
GDUL01011852	OeUP-16	F: *CCACCTCCAAGCCTCAGTAA R: GCCCACGTGCATCAAGAAAT	(TC)10	5' UTR	60, 55	234-258	growth regulator-like protein [Medicago truncatula]; XP_003601898.2

Se nadaljuje.

**Nadaljevanje preglednice 3:** Seznam na novo razvitih markerjev EST-SSR oljke  
**Continuing table 3:** List of newly developed EST-SSR primer pairs in olive

Akcesijska številka	Lokus	Nukleotidno zaporedje parov začetnih oligonukleotidov (5'-3')	Mikrosatelitska ponovitev	Lega mikrosatelite	T <sub>a1</sub> , T <sub>a2</sub> (°C)	Razpon dolžine alelov (bp)	Domnevna funkcija; akcesijska številka
GDUL01008290	OeUP-17	F: *TCTGGCCTGAGACCTAAACA R: CGTGGAGTAATTCATTGGATG	(GA)11	5' UTR	50, 45	158-167	Embryo sac development arrest 6, putative [ <i>Theobroma cacao</i> ]; XP_007035194.1
GDUL01002948	OeUP-18	F: *TACCCGTTCCCTTCACTTG R: AGCTGGTGACCCTACAATGG	(TCC)9	CDS	50, 45	177-200	disease resistance response protein 206-like [ <i>Glycine max</i> ]; XP_003525358.1
GDUL01011678	OeUP-19	F: *TACAATTCATCTGCGGCATC R: GGCTTCGATTGATTTGCTGT	(GA)10	3' UTR	58, 53	175-183	E3 ubiquitin-protein ligase CIP8 [ <i>Erythranthe guttatus</i> ]; XP_012839188.1
GDUL01012584	OeUP-20	F: *ACCAACCGAGCAAAGCAAAA R: TTGCCATCGTCTGAGAGTGT	(TTC)7	5' UTR	50, 45	191-212	hypothetical protein CICLE_v10016930mg [ <i>Citrus clementina</i> ]; XP_006445829.1
GDUL01010877	OeUP-21	F: *GGCTGAAGTGAAAGCAAAGG R: GCGGACAAGTGGATGTACT	(AC)15	3' UTR	55, 50	190-205	intersectin-1 [ <i>Nicotiana tomentosiformis</i> ]; XP_009631701.1
GDUL01019797	OeUP-22	F: *TAGATTCAAAGGGCGGCTAA R: GAGGATCTATGGCATCGTCA	(GA)13	5' UTR	50, 45	153-184	MIP18 family protein At1g68310-like [ <i>Solanum tuberosum</i> ]; XP_006366991.1
GDUL01016632	OeUP-23	F: *CAATTGCTGCTGCTGACTTC R: CATTCAAGTCCCTCCCTCCA	(AGA)7	CDS	53, 48	194-197	senescence-associated family protein [ <i>Populus trichocarpa</i> ]; XP_006372581.1
GDUL01018333	OeUP-24	F: *ACCAGATGAAAACTCGTGATCT R: ATACGTTCGTCTAGCAGCCA	(CAG)7	5' UTR	53, 48	185-200	UBP1-associated proteins 1C [ <i>Vitis vinifera</i> ]; XP_002280767.1

Se nadaljuje.

**Nadaljevanje preglednice 3:** Seznam na novo razvitih markerjev EST-SSR oljke  
**Continuing table 3:** List of newly developed EST-SSR primer pairs in olive

Akcesijska številka	Lokus	Nukleotidno zaporedje parov začetnih oligonukleotidov (5'-3')	Mikrosatelitska ponovitev	Lega mikrosatelita	T <sub>a1</sub> , T <sub>a2</sub> (°C)	Razpon dolžine alelov (bp)	Domnevna funkcija; akcesijska številka
GDUL01023602	OeUP-25	F: *AACATTTCGACCATTCCA R: TCAATTGGCTTCTTCCCTCA	(ATC)7	5' UTR	55, 50	171-178	poly(ADP-ribose) glycohydrolase 1 isoform X1 [ <i>Vitis vinifera</i> ]; XP_002280371.1
GDUL01004307	OeUP-26	F: *AGGAAGTAGCAGCACCAAGTT R: TCCCTCCTTCCTGGCTTT	(GAT)7	3' UTR	53, 48	177-204	60S ribosomal protein L36-2-like [ <i>Gossypium raimondii</i> ]; XP_012482487.1
GDUL01015903	OeUP-27	F: *GGCTCACCCCTTCAGTTCA R: CAGCCCATGAATCAGCATCC	(TTC)9	5' UTR	55, 50	159-181	protein dehydration-induced 19 homolog 3-like isoform X1 [ <i>Erythranthe guttatus</i> ]; XP_012837687.1
GDUL01057837	OeUP-28	F:TTTTAGTTCAAACACTACATAGGAACGTA R: *CAAGCTGGTGCCTTATGGTT	(AG)10	5' UTR	50, 45	152-184	glutaredoxin-C9-like [ <i>Nicotiana sylvestris</i> ]; XP_009767693.1
GDUL01000197	OeUP-29	F: *GTCCTGCCTTCAAGATCCAC R: GCGGTGGCCTGAGATACTTA	(CA)10	CDS	55, 50	205-215	protein yippee-like At5g53940-like [ <i>Solanum tuberosum</i> ]; XP_006358970.1
GDUL01007444	OeUP-30	F:GAGTCACACTCGTCCCTACCA R: *GAATCGCGCGTAAACATT	(AC)11	5' UTR	55, 50	190-196	autophagy-related protein 8i-like [ <i>Solanum tuberosum</i> ]; NP_001275429.1
GDUL01003407	OeUP-31	F: *CATTTCGACCAACTGATGAA R: TCTTCTTGCGGTTAGGTTGC	(ACC)8	5' UTR	60, 55	203-212	E3 ubiquitin-protein ligase UBR2 [ <i>Sesamum indicum</i> ]; XP_011077478.1
GDUL01001906	OeUP-32	F: *ACGAACCGTGGCAGTACATT R: CCTTCCCTTGCCTGTATGA	(AGA)7	5' UTR	55, 50	171-188	Rubredoxin-like superfamily protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]; XP_007038169.1

Se nadaljuje.

**Nadaljevanje preglednice 3:** Seznam na novo razvitih markerjev EST-SSR oljke  
**Continuing table 3:** List of newly developed EST-SSR primer pairs in olive

Akcesijska številka	Lokus	Nukleotidno zaporedje parov začetnih oligonukleotidov (5'-3')	Mikrosatelitska ponovitev	Lega mikrosatelite	T <sub>a1</sub> , T <sub>a2</sub> (°C)	Razpon dolžine alelov (bp)	Domnevna funkcija; akcesijska številka
GDUL01002038	OeUP-33	F: *ACGTCAACCATGCTTCAACC R: TCAGTACCGAACAGCAGCCATA	(TCA)7	3' UTR	53, 48	220-234	Cold-regulated 413-plasma membrane 2 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]; XP_007047094.1
GDUL01058412	OeUP-34	F: CCTTCATAGGCAAAATGGTCA R: *CACCAAAGCATTGCAGAGA	(GA)12	3' UTR	55, 50	193-226	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 3 [ <i>Actinidia eriantha</i> ]; ACD03213.1
GDUL01009565	OeUP-35	F: *GGTGGGGTCTGAATATATGTCA R: GGCAATGACTTACGACAAGA	(ATT)7	3' UTR	58, 53	225-231	hypothetical protein MIMGU_mgv1a003502mg [ <i>Erythranthe guttata</i> ]; EYU41540.1
GDUL01055178	OeUP-36	F: *TGCTTTCTCATTTCACCA R: AGACTGCACCACCATCATCA	(GTC)7	3' UTR	58, 53	142-154	ADNP homeobox protein 2 [ <i>Tupaia chinensis</i> ]; XP_006165827.1
GDUL01015452	OeUP-37	F: *AATGGCTGCGAAATGAGAAG R: CAAAGATTCAATTGTTCTTGGT	(TTC)9	CDS	50, 45	148-188	pentatricopeptide repeat-containing protein, putative [ <i>Ricinus communis</i> ]; XP_002509440.1
GDUL01057556	OeUP-38	F: *AGAACCAACCTCAACCACCAA R: GTCGTCTGTTGGCGATA	(CAT)7	CDS	53, 48	150-167	Serine/threonine-protein kinase HuHRK1 [ <i>Hanseniaspora uvarum</i> DSM 2768]; KKA02402.1
GDUL01033407	OeUP-39	F: *TCTCGGTTCCCTCCATTCCA R: GCGAACAGAAATACATACAAGG	(AG)10	3' UTR	50, 45	193-209	hypothetical protein L484_004798 [ <i>Morus notabilis</i> ]; XP_010099372.1
GDUL01030115	OeUP-40	F: *ACCCAGTAGCTTAAATCTGT R: ACGACGATGCGATTCTTCA	(TCT)7	3' UTR	53, 48	179-197	High chlorophyll fluorescence phenotype 173 protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]; XP_007023557.1

Se nadaljuje.

**Nadaljevanje preglednice 3:** Seznam na novo razvitih markerjev EST-SSR oljke  
**Continuing table 3:** List of newly developed EST-SSR primer pairs in olive

Akcesijska številka	Lokus	Nukleotidno zaporedje parov začetnih oligonukleotidov (5'-3')	Mikrosatelitska ponovitev	Lega mikrosatelite	T <sub>a1</sub> , T <sub>a2</sub> (°C)	Razpon dolžine alelov (bp)	Domnevna funkcija; akcesijska številka
GDUL01029326	OeUP-41	F: *CGGTGACCCTTAGCCTGTA R: ATCAGAGGCTTCGAGGAGGT	(AAG)7	CDS	50, 45	160-163	lisH domain-containing protein C1711.05-like [Citrus sinensis]; XP_006482262
GDUL01034902	OeUP-42	F: *CGATTCAAAGGAAATCGAA R: ACCCGCAATTACCATGAAA	(CTG)8	CDS	58, 53	162-183	vacuolar protein sorting-associated protein 8 homolog isoform X1 [Vitis vinifera]; XP_002267626.3
GDUL01048166	OeUP-43	F: AAAATCAAACACAACCTGGCAAT R: *CTTCCAATCTGAAAATGCACA	(TTC)7	CDS	50, 45	195-231	TrbL/VirB6 plasmid conjugal transfer protein [Neisseria wadsworthii]; ZP_08940344.1
GDUL01050680	OeUP-44	F: *TCAGGTTCTGGCAAGGATTCT R: TTCATCCCTCTGCTGCTCT	(GCT)7	CDS	58, 53	149-155	protein MEI2-like 4 isoform X3 [Vitis vinifera]; XP_010657314.1
KU70983	OeUP-45	F: *GGCCAATCAATGAACCGAGCA R: AGGGCTTGATTCTAACGCTCA	(AAG)7	CDS	50, 45	145-168	flavonoid-related R2R3 MYB 4a repressor transcription factor [Vitis vinifera]; NP_001268129.1
GDUL01050819	OeUP-46	F: *TCTTCCTGGTATTGTTCGGT R: ACAAGAGTATATGCCACACA	(AAT)7	CDS	58, 53	201-204	hypothetical protein [Methylococcaceae bacterium 73a]; WP_045223293.1

\*Začetni oligonukleotidi, podaljšani za M13 (-21) univerzalni začetni oligonukleotid (5'-TGTAAAACGACGCCAGT-3') na 5' koncu.

## 4.2 POTRDITEV NOVIH MARKERJEV EST-SSR S SEKVENČNO REAKCIJO

Istovetnost vseh 46 novih markerjev EST-SSR smo potrdili tudi s sekvenčno reakcijo. Pri vsakem lokusu EST-SSR smo izbrali tiste sorte, ki so bile homozigotne ter za posamezen vzorec DNA naredili dve sekvenčni reakciji, eno v smeri vodilnega in drugo v smeri povratnega začetnega oligonukleotida. Pri posameznem lokusu smo dobljena zaporedja sekvenciranih alelov poravnali z originalnim zaporedjem EST ‘Istrske belice’, na podlagi katerih so bili razviti začetni oligonukleotidi. Poravnave za vseh 46 lokusov EST-SSR so zbrane v Prilogi A. Sledila je analiza sekvenciranih alelov, kjer smo preverili prisotnost predvidenega mikrosatelita, število ponovitev osnovnega mikrosatelitskega motiva, prisotnost mutacij na mestu prileganja začetnih oligonukleotidov in indel mutacij (insercije in delecije nukleotidov) v obrobnih regijah mikrosatelita (Preglednica 4).

**Preglednica 4:** Analiza sekvenciranih alelov, pomnoženih z novimi markerji EST-SSR oljke. Mikrosatelitska ponovitev originalnega zaporedja EST-SSR, mikrosatelitska ponovitev sekvenciranega alela, mutacije na mestu prileganja začetnih oligonukleotidov, indel mutacije v obrobnih regijah mikrosatelita  
**Table 4:** Sequencing analysis of amplified alleles using new EST-SSR primers in olive. Repeat motif of original EST sequence, repeat motif of sequenced alleles, mutations in the primer sites, indels in the flanking regions

Lokus	Mikrosatelitska ponovitev referenčnega zaporedja EST	Mikrosatelitska ponovitev sekvenciranega alela	Mutacije na mestu prileganja začetnih oligonukleotidov		Indel mutacije v obrobnih regijah mikrosatelita
			vodilni začetni oligonukleotid	povratni začetni oligonukleotid	
<b>OeUP-01</b>	(AAG)11	(AAG)5	/	/	/
<b>OeUP-02</b>	(TGC)7	(TGC)6	/	•	•
		(TGC)6	/	/	/
<b>OeUP-03</b>	(TC)13(AC)8	(TC)13(AC)8	/	•	•
<b>OeUP-04</b>	(TCT)7	(TCT)9	/	•	/
<b>OeUP-05</b>	(CAG)8	(CAG)4	•	/	/
<b>OeUP-06</b>	(TTC)11	(TTC)7	/	/	/*
<b>OeUP-07</b>	(GA)11	(GA)15	/	/	•
		(GA)16	/	/	•
<b>OeUP-08</b>	(TGC)7	(TGC)3	/	/	/*
<b>OeUP-09</b>	(TGA)8	(TGA)5	/	/	•
<b>OeUP-10</b>	(TCG)7	(TCG)7	/	/	•
		(TCG)5	/	/	•
<b>OeUP-11</b>	(TGG)7	(TGG)8	/	/	/
<b>OeUP-12</b>	(TGTA)6	(TGTA)4	/	/	/*
<b>OeUP-13</b>	(TATG)7	(TATG)5	/	/	/*
		(TATG)4	/	/	/*
<b>OeUP-14</b>	(AC)11	(AC)11	•	/	/
		(AC)9	/	/	/*

Se nadaljuje.

**Nadaljevanje preglednice 4:** Analiza sekvenciranih alelov, pomnoženih z novimi markerji EST-SSR oljke  
**Continuing table 4:** Sequencing analysis of amplified alleles using new EST-SSR primers in olive

Lokus	Mikrosatelitska ponovitev referenčnega zaporedja EST	Mikrosatelitska ponovitev sekvenciranega alela	Mutacije na mestu prileganja začetnih oligonukleotidov		Indel mutacije v obrobnih regijah mikrosatelita
			vodilni začetni oligonukleotid	povratni začetni oligonukleotid	
OeUP-15	(GTG)7	(GTG)7	/	/	/*
		(GTG)5	/	/	/*
OeUP-16	(TC)10	(TC)10	/	/	•
OeUP-17	(GA)11	(GA)7	/	/	•
OeUP-18	(TCC)9	(TCC)7	/	/	/
		(TCC)3	/	/	/
OeUP-19	(GA)10	(GA)10	/	•	•
OeUP-20	(TTC)7	(TTC)6	•	/	•
		(TTC)6	/	/	•
OeUP-21	(AC)15	(AC)12	/	/	•
OeUP-22	(GA)13	(GA)13	/	•	/
OeUP-23	(AGA)7	(AGA)7	/	/	•
OeUP-24	(CAG)7	(CAG)7	•	/	•
OeUP-25	(ATC)7	(ATC)7	/	/	•
OeUP-26	(GAT)7	(GAT)7	/	/	•
		(GAT)8	/	/	/
OeUP-27	(TTC)9	(TTC)7	/	/	/*
OeUP-28	(AG)10	(AG)10	/	/	•
		(AG)10	/	/	/*
OeUP-29	(CA)10	(CA)10	/	/	•
		(CA)10	/	/	•
OeUP-30	(AC)11	(AC)10	/	/	/
OeUP-31	(ACC)8	(ACC)6	/	/	/*
OeUP-32	(AGA)7	(AGA)7	/	/	/
		(AGA)6	/	/	/*
OeUP-33	(TCA)7	(TCA)7	/	/	/*
		(TCA)7	/	/	•
OeUP-34	(GA)12	(GA)17	•	/	•
OeUP-35	(ATT)7	(ATT)7	/	/	/*
OeUP-36	(GTC)7	(GTC)5	/	/	•
OeUP-37	(TTC)9	(TTC)10	/	/	/*
OeUP-38	(CAT)7	(CAT)6	•	/	•
OeUP-39	(AG)10	(AG)10	/	/	/
		(AG)11	/	/	/
OeUP-40	(TCT)7	(TCT)6	/	/	•
OeUP-41	(AAG)7	(AAG)6	/	/	•
		(AAG)6	/	/	•

Se nadaljuje.

**Nadaljevanje preglednice 4:** Analiza sekvenciranih alelov, pomnoženih z novimi markerji EST-SSR oljke  
**Continuing table 4:** Sequencing analysis of amplified alleles using new EST-SSR primers in olive

Lokus	Mikrosatelitska ponovitev referenčnega zaporedja EST	Mikrosatelitska ponovitev sekvenciranega alela	Mutacije na mestu prileganja začetnih oligonukleotidov		Indel mutacije v obrobnih regijah mikrosatelita
			vodilni začetni oligonukleotid	povratni začetni oligonukleotid	
<b>OeUP-42</b>	(CTG)8	(CTG)6	/	/	/*
<b>OeUP-43</b>	(TTC)7	(TTC)4	/	/	•
<b>OeUP-44</b>	(GCT)7	(GCT)6	/	/	/*
		(GCT)5	/	/	/
<b>OeUP-45</b>	(AAG)7	(AAG)7	/	/	/*
		(AAG)6	/	•	•
<b>OeUP-46</b>	(AAT)7	(AAT)7	/	/	•
<b>Skupaj</b>	/	63	6	6	30

/ Mutacije niso prisotne.

• Mutacije so prisotne.

\* Obrobne regije mikrosatelitov 100 % homologne z originalnim zaporedjem EST ‘Istrske belice’.

Iz preglednice 4 je razvidno, da smo s pomočjo sekvenčne reakcije določili nukleotidno zaporedje 63 različnih alelov. Pri vseh analiziranih aleilih se je osnovni mikrosatelitski motiv ujemal z motivom v originalnem zaporedju EST ‘Istrske belice’. S tem smo pri vseh 46 na novo razvitih markerjih EST-SSR potrdili pomnoževanje predvidenega mikrosatelitskega motiva. S sekvenčno reakcijo nismo le potrdili mikrosatelitov, temveč smo odkrili tudi prisotnost točkovnih mutacij, kot so insercije ali delekcije (indel mutacije) in substitucije.

Pri 21 lokusih EST-SSR v obrobnih regijah mikrosatelitov nismo odkrili indel mutacij. Med njimi se je pri lokusih OeUP-01, OeUP-04, OeUP-05, OeUP-06, OeUP-08, OeUP-11, OeUP-12, OeUP-13, OeUP-18, OeUP-27, OeUP-30, OeUP-31, OeUP-37, OeUP-42 in OeUP-44 število ponovitev osnovnega mikrosatelitskega motiva pri sekvenciranih aleilih razlikovalo od števila ponovitev v originalnem zaporedju EST ‘Istrske belice’. Različne dolžine alelov na teh lokusih so bile posledica različnega števila ponovitev osnovnega mikrosatelitskega motiva. Slika 13 prikazuje poravnavo sekvenciranih alelov lokusa OeUP-13 za sorti ‘Athena’ in ‘Oblica’, ki sta bili na danem lokusu homozigotni ter originalno zaporedje EST ‘Istrske belice’. Iz slike je razvidno, da je šlo za mikrosatelitski motiv TATG, ki se je pri sorti ‘Athena’ ponovil 5-krat in je dolžina alela znašala 166 bp. Pri sorti ‘Oblica’ se je motiv ponovil 4-krat, zato je bila dolžina alela sorazmerno krajsa za štiri nukleotide in je znašala 162 bp. Pri lokusih OeUP-14, OeUP-15, OeUP-22, OeUP-32, OeUP-35 in OeUP-39 se je število ponovitev osnovnega mikrosatelitskega motiva sekvenciranih alelov ujemalo s številom ponovitev v originalnem zaporedju EST ‘Istrske belice’. S tem so bili skladni tudi rezultati genotipizacije, kjer smo pri sortah sekvenciranih alelov in pri ‘Istrski belici’ identificirali alele z enakimi dolžinami.

Pri lokusih OeUP-14, OeUP-15, OeUP-32 in OeUP-39 smo ugotovili tudi alele, kjer se število ponovitev osnovnega mikrosatelitskega motiva sekvenciranih alelov ni ujemalo s številom ponovitev v originalnem zaporedju EST ‘Istrske belice’ in so bile dolžine alelov sorazmerno krajše ali daljše.

#OeUP-13-EST-IstrskaBelica	<u>CAATAACCCC</u> ATCAGCAGCC ACTGCACATT
#OeUP-13-Athena-166bp	.....
#OeUP-13-Oblica-162bp	.....
#OeUP-13-EST-IstrskaBelica	GGTAATTGGA TAATATAAAA TCAAGAGCAG
#OeUP-13-Athena-166bp	.....
#OeUP-13-Oblica-162bp	.....
#OeUP-13-EST-IstrskaBelica	AAACACCATC CACGCCCGTA <span style="background-color: #cccccc;">TATGTATGTA</span>
#OeUP-13-Athena-166bp	.....
#OeUP-13-Oblica-162bp	.....
#OeUP-13-EST-IstrskaBelica	TGTATGTATG TATGTATGTG CTTTAGAGTG
#OeUP-13-Athena-166bp	.....
#OeUP-13-Oblica-162bp	.....
#OeUP-13-EST-IstrskaBelica	AGAGTAAACA TGTGAAGATG AATAAGAATT
#OeUP-13-Athena-166bp	.....
#OeUP-13-Oblica-162bp	.....
#OeUP-13-EST-IstrskaBelica	<u>GACTGCAAGG</u> TTTAATGGA CT
#OeUP-13-Athena-166bp	.....
#OeUP-13-Oblica-162bp	.....

**Slika 13:** Poravnava sekvenciranega alela mikrosatelitskega lokusa OeUP-13 sort ‘Athena’ in ‘Oblica’ ter referenčnega zaporedja EST ‘Istrske belice’. Mikrosatelitski motiv je prikazan v sivem okvirju. Nukleotidno zaporedje para začetnih oligonukleotidov je podčrtano

**Figure 13:** Multiple alignment of sequenced alleles of microsatellite locus OeUP-13 of varieties ‘Athena’ and ‘Oblica’ and reference EST sequence of ‘Istrska belica’. The microsatellite motif is shown within the grey frame. Primer sequence is underlined

Pri 19 lokusih smo v obrobnih regijah mikrosatelitov odkrili indel mutacije. Pri lokusih OeUP-03, OeUP-16, OeUP-19, OeUP-23, OeUP-24, OeUP-25, OeUP-29 in OeUP-46 lahko sklepamo, da so na različne dolžine alelov vplivale samo indel mutacije, saj se je število ponovitev osnovnega mikrosatelitskega motiva sekvenciranih alelov ujemalo s številom ponovitev v originalnem zaporedju EST ‘Istrske belice’. Za lokuse OeUP-07, OeUP-09, OeUP-17, OeUP-20, OeUP-21, OeUP-34, OeUP-36, OeUP-38, OeUP-40, OeUP-41 in OeUP-43 so bile značilne indel mutacije in različno število ponovitev osnovnega mikrosatelitskega motiva sekvenciranih alelov, ki so lahko vodili v dolžinski polimorfizem.

#OeUP-02-EST-IstrskaBelica	TTTGTGCGCTT	GCAGATTCCC	GGGAAGCTTT
#OeUP-02-Moraiolo-207-bp	.....	.....	.....
#OeUP-02-LeccioDelCorno-212-bp	.....	.....	.....
#OeUP-02-EST-IstrskaBelica	GTATGGTCTT	AGTTCTCTGG	ACGATGACAT
#OeUP-02-Moraiolo-207-bp	.....A..	.....	....C.....
#OeUP-02-LeccioDelCorno-212-bp	.....A..	.....	.....
#OeUP-02-EST-IstrskaBelica	TAAATCATTG	TATGGGTGCT	GCCGCGCAAC
#OeUP-02-Moraiolo-207-bp	.....G.....	T..	....A.....
#OeUP-02-LeccioDelCorno-212-bp	.....	.....	.....
#OeUP-02-EST-IstrskaBelica	TGAGTTAAA	TTATATCATT	CCTTGATGTT
#OeUP-02-Moraiolo-207-bp	.....	.....	....G....
#OeUP-02-LeccioDelCorno-212-bp	.....	.....	.....
#OeUP-02-EST-IstrskaBelica	GCGTATCAGT	GAGAGGAAAA	TCCTCGAGAA
#OeUP-02-Moraiolo-207-bp	A.....C	.....	.....
#OeUP-02-LeccioDelCorno-212-bp	.....	.....	.....
#OeUP-02-EST-IstrskaBelica	ACTGAGATGT	TATGCTGCTG	CTGCTGCTGC
#OeUP-02-Moraiolo-207-bp	.....	.....	.....
#OeUP-02-LeccioDelCorno-212-bp	.....	.....	.....
#OeUP-02-EST-IstrskaBelica	TGCTGGTGCT	AGGATTCCGA	CAACTGGTAA
#OeUP-02-Moraiolo-207-bp	-----	--A.G...T.	.....
#OeUP-02-LeccioDelCorno-212-bp	---	.....	.....
#OeUP-02-EST-IstrskaBelica	GGGAG		
#OeUP-02-Moraiolo-207-bp	....		
#OeUP-02-LeccioDelCorno-212-bp	....		

**Slika 14:** Poravnava sekvenciranega alela mikrosatelitskega lokusa OeUP-34 sorte ‘Cipressino’ in referenčnega zaporedja EST ‘Istrske belice’. Mikrosatelitski motiv je prikazan v sivem okvirju. Nukleotidno zaporedje para začetnih oligonukleotidov je podprtano

**Figure 14:** Multiple alignment of sequenced alleles of microsatellite locus OeUP-34 of variety ‘Cipressino’ and reference EST sequence of ‘Istrska belica’. The microsatellite motif is shown within the grey frame. Primer sequence is underlined

Slika 14 prikazuje poravnavo sekvenciranih alelov lokusa OeUP-02 za sorte ‘Moraiolo’ in ‘Leccio del Corno’ ter originalno zaporedje EST ‘Istrske belice’. Iz slike je razvidno, da je šlo za mikrosatelitski motiv TGC, ki se je pri zaporedju EST ‘Istrske belice’ ponovil 7-krat in pri sortah ‘Moraiolo’ ter ‘Leccio del Corno’ 6-krat. Čeprav se število ponovitev mikrosatelitskega motiva pri sortah ‘Moraiolo’ in ‘Leccio del Corno’ ujema, se dolžini alelov, ki smo ju določili z genotipizacijo, razlikujeta. Pri sorti ‘Moraiolo’ je dolžina alela krajsa, kar je lahko posledica delecije devetih nukleotidov.

Pri preostalih šestih lokusih (OeUP-02, OeUP-10, OeUP-26, OeUP-28, OeUP-33 in OeUP-45) smo odkrili različne primere: (1) enako število ponovitev mikrosatelitskega

motiva pri sekvenciranem alelu in originalnem zaporedju EST ‘Istrske belice’, brez (OeUP-28, OeUP-33, OeUP-45) oz. s prisotnimi indel mutacijami v obrobnih regijah mikrosatelita (OeUP-10, OeUP-26, OeUP-28, OeUP-33); (2) različno število ponovitev mikrosatelitskega motiva pri sekvenciranem alelu in originalnem zaporedju EST ‘Istrske belice’, brez (OeUP-02, OeUP-26) oz. s prisotnimi indel mutacijami v obrobnih regijah mikrosatelita (OeUP-02, OeUP-10, OeUP-45).

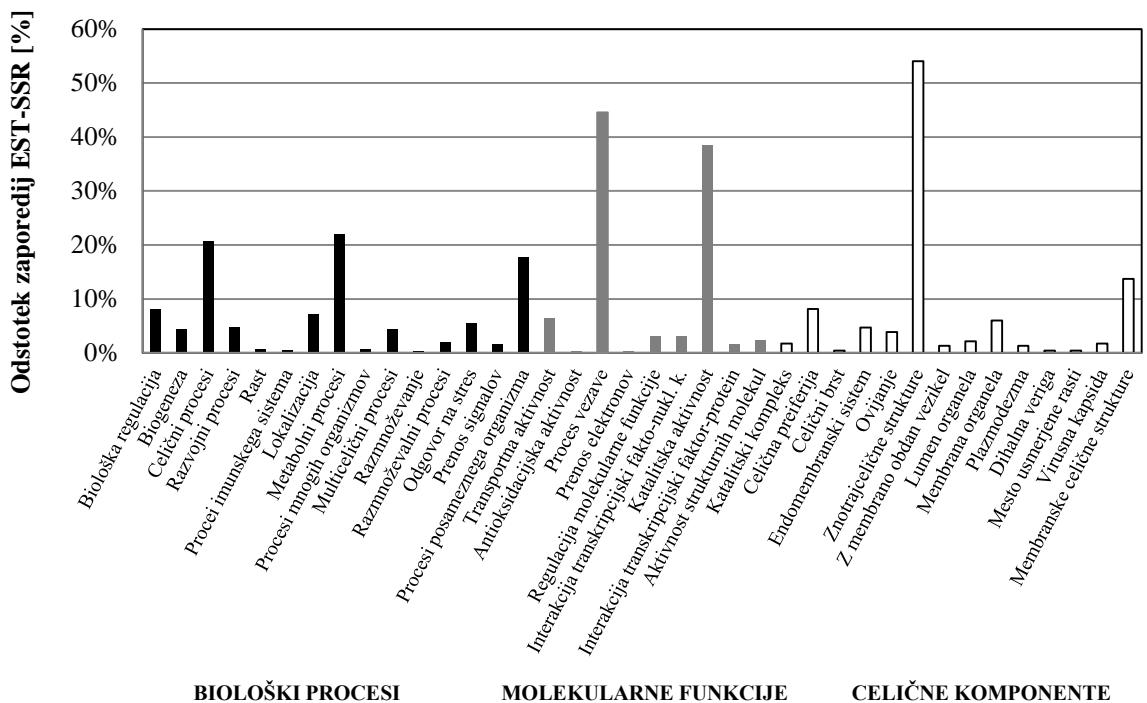
S sekvenčno reakcijo smo določili nukleotidno zaporedje 63 alejom. Prvo skupino predstavlja 33 (52 %) alelov, pri katerih v obrobnih regijah mikrosatelitov nismo odkrili indel mutacije. Na raznolikost dolžin alelov je vplivalo le različno število ponovitev osnovnega mikrosatelitskega motiva. Kar 18 alelov iz te skupine je imelo obrobne regije mikrosatelitov v celoti homologne z originalnim zaporedjem EST ‘Istrske belice’ in so v Preglednici 4 označeni z zvezdico. Pri preostalih aleilih (15) smo v obrobnih regijah mikrosatelitov odkrili substitucije posameznih nukleotidov, ki niso dodatno vplivale na dolžine sekvenciranih alelov. V drugo skupino sodijo aleli, pri katerih so bile v obrobnih regijah mikrosatelitov prisotne indel mutacije in takih je bilo 30 alelov (48 %) (Preglednica 4). Pri teh aleilih so na različne dolžine alelov vplivale bodisi samo indel mutacije ali pa kombinacija indel mutacij in različnega števila ponovitev mikrosatelitskega motiva. Vse dolžine sekvenciranih alelov so bile v pričakovanem območju, saj so bile identificirane indel mutacije razmeroma kratke. V večini primerov je šlo za insercijo ali delecijo od 1 do 5 nukleotidov. Indel mutacije 6 nukleotidov smo identificirali pri lokusih OeUP-20 in OeUP-33, 7 nukleotidov pri OeUP-36 in 9 nukleotidov pri lokusu OeUP-02.

Pri vsakem sekvenciranem alelu smo preverili prisotnost mutacij na mestu prileganja začetnih oligonukleotidov. Mutacije so bile prisotne pri 12 lokusih EST-SSR. Na šestih lokusih smo odkrili mutacije na mestih prileganja vodilnih začetnih oligonukleotidov. Med njimi je prevladovala substitucija enega nukleotida (OeUP-05, OeUP-14, OeUP-34), na lokusih OeUP-20 in OeUP-38 smo ugotovili substitucijo dveh nukleotidov ter na lokusu OeUP-24 delecijo enega nukleotida. Mutacije na mestih prileganja povratnih začetnih oligonukleotidov smo prav tako ugotovili na šestih lokusih. Tudi v tem primeru je prevladovala substitucija enega nukleotida (OeUP-02, OeUP-19, OeUP-22, OeUP-45), na lokusu OeUP-03 smo ugotovili substitucijo treh nukleotidov in na lokusu OeUP-04 delecijo enega nukleotida. Mutacije na mestu prileganja začetnih oligonukleotidov so bile pogosteje na tistih lokusih (OeUP-02, OeUP-03, OeUP-19, OeUP-20, OeUP-24, OeUP-34, OeUP-38, OeUP-45), pri katerih smo odkrili tudi indel mutacije. Ti rezultati kažejo, da so pri novo razvitih markerjih EST-SSR mesta vezave začetnih oligonukleotidov dobro ohranjena, kar je pomembno za nadaljnje uspešno pomnoževanje teh markerjev.

#### 4.3 ANALIZA MIKROSATELITSKIH SEKVENC TRANSKRIPTOMA OLJKE

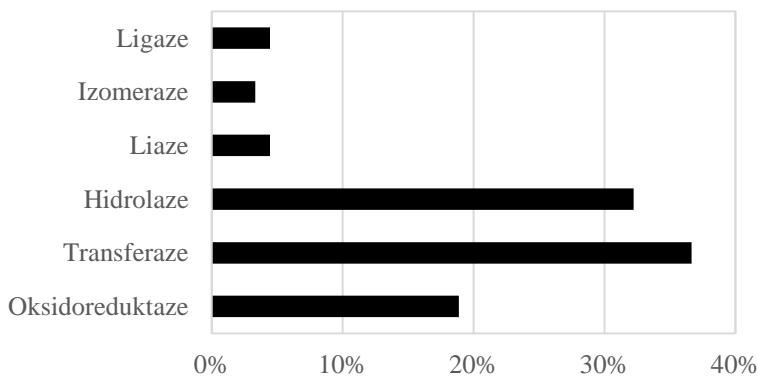
Vseh 923 zaporedij EST, v katerih smo identificirali mikrosatelitske markerje, smo vključili tudi v funkcijsko analizo. S pomočjo programa Blast2GO smo 247 zaporedjem EST (26,8 %) uspešno pripisali znane proteinske produkte. 138 zaporedij EST (14,9 %) je bilo homolognih s t.i. hipotetičnimi/neznanimi/neimenovanimi proteini, med tem ko 538 zaporedij EST (58,3 %) ni imelo po analizi BLASTX nobenega proteinskega zadetka. Med vsemi uspešno anotiranimi zaporedji EST jih je imelo največ (109) BLAST ujemanje z zaporedji iz rastline *Sesamum indicum* in le 6 zaporedij EST je imelo ujemanje s podatkovno bazo *Olea europaea* L.

Vsem 247 zaporedjem EST so bile na podlagi znanega proteinskega produkta pripisane GO kategorije, in sicer na ravni bioloških procesov, molekularnih funkcij in celičnih komponent (Slika 15). Največ GO tērminov (671) je bilo dodeljenih kategoriji biološki procesi, kategoriji molekularne funkcije je bilo dodeljenih 265 GO tērminov in 233 kategoriji celične komponente. Pri bioloških procesih je bilo največ anotiranih zaporedij EST na drugem GO nivoju. Pri tem je bilo 21,9 % vlog pripisanih metabolnim procesom, 20,7 % vlog celičnim procesom in 17,7 % vlog procesom, ki so značilni za posamezen organizem. V nižjih odstotkih so sledile vloge, povezane z biološko regulacijo (8,1 %), lokalizacijo (7,2 %), odgovorom na stres (5,5 %), razvojnimi procesi (4,8 %), biogenezo (4,3 %) in z drugimi biološkimi procesi. V kategoriji molekularne funkcije je bilo zaporedjem EST prav tako največ vlog pripisanih na drugem GO nivoju. Od tega je bilo kar 44,5 % vlog pripisanih procesom vezave, pri čemer so bile najpogostejše vloge povezane z vezavo ionov (34,0 %) in z vezavo ATP (20,0 %). V kategoriji molekularne funkcije je procesom vezave sledila še katalitska aktivnost z 38,5 % ter v nižjih odstotkih transportna aktivnost (6,4 %), regulacija molekularnih funkcij (3,0 %) in interakcija transkripcijskega faktorja z nukleinsko kislino (3,0 %). Na ravni celičnih komponent je bilo zaporedjem EST največ vlog pripisanih na četrtem GO nivoju. Več kot polovica vlog (54,1 %) je bila pripisanih znotrajceličnim strukturam, v nižjih odstotkih so sledile vloge, pripisane membranskim celičnim strukturam (13,7 %), perifernem delu celice (8,2 %) in membranam organelov (6,0 %).



**Slika 15:** Funkcijska analiza 247 zaporedij EST-SSR oljke z uporabo programskega paketa Blast2GO  
**Figure 15:** Functional analysis of 247 SSR containing ESTs in olive based on Blast2GO analysis

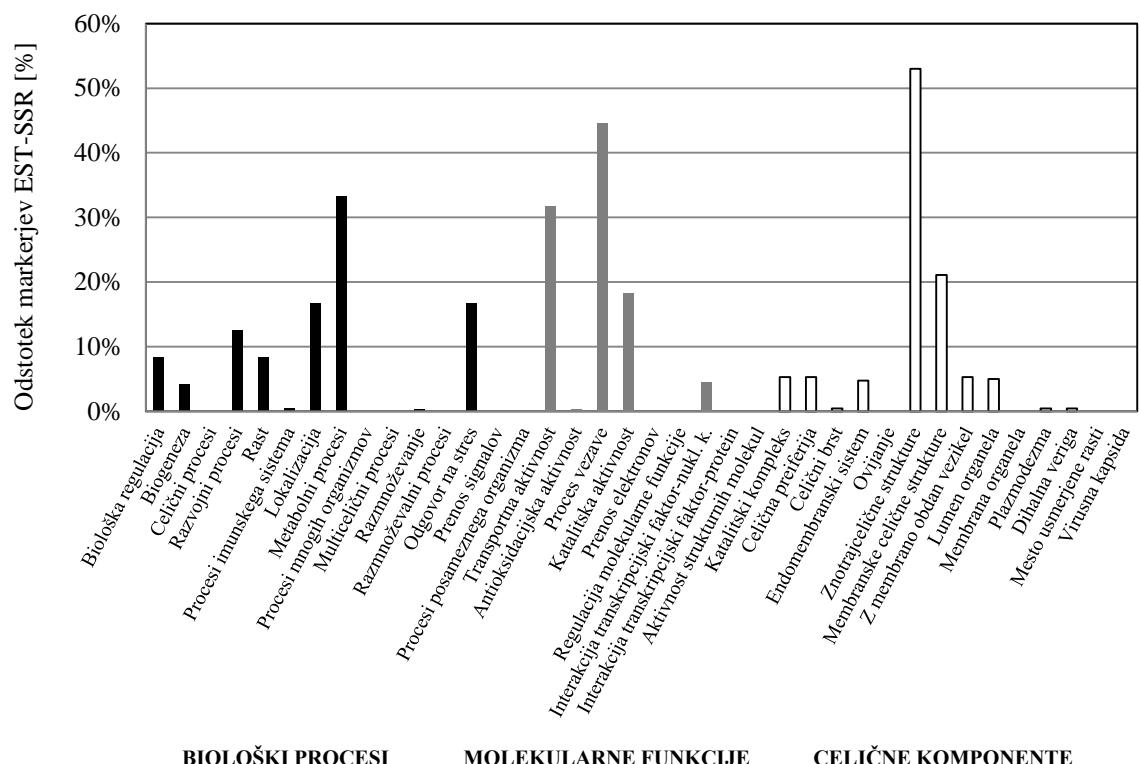
S pomočjo programskega paketa Blast2GO in enciklopedije KEGG smo med 247 anotiranimi zaporedji EST poiskali tista zaporedja EST, ki kodirajo encime, vključene v metabolne in biosinteze poti. Identificiranih je bilo 55 različnih metabolnih in biosintezih poti. Ker je oljka pomembna rastlina za pridobivanje olja, smo se osredotočili na tista zaporedja EST, ki so bila povezana z metabolizmom oljčnega plodu. Za večino zaporedij EST je bilo določeno, da kodirajo tri večje skupine encimov: transferaze (37 %), hidrolaze (33 %) in oksidoreduktaze (19 %) (Slika 16).



**Slika 16:** Odstopek (%) zaporedij EST-SSR oljke, ki kodirajo encime  
**Figure 16:** Frequencies of enzyme coding EST-SSRs in olive

Gledano bolj specifično, so se zaporedja EST izkazala kot odgovorna za sintezo encimov, ki so vključeni v biosintezo sekundarnih metabolitov, in sicer terpenoidov in flavonoidov, kot tudi v biosintezo naslednjih lipidov: maščobnih kislin, steroidov in sfingolipidov.

Posebej smo pregledali še vse nove anotirane markerje EST-SSR. Na podlagi znanega proteinskega produkta smo GO kategorije, na ravni bioloških procesov, molekularnih funkcij in celičnih komponent, uspeli pripisati dobri polovici markerjev (54 %). Med temi je bilo največ GO tèrminov (52) dodeljenih kategoriji biološki procesi, kategoriji molekularne funkcije je bilo dodeljenih 25 GO tèrminov in 20 kategoriji celične komponente. Pri bioloških procesih je bilo največ anotiranih markerjev EST-SSR povezanih z metabolnimi procesi (33,3 %), lokalizacijo (17,0 %) in odgovorom na stres (17,0 %). V nižjih odstotkih so sledile vloge, povezane z razvojnimi procesi (12,5 %), biološko regulacijo (8,3 %) in rastjo (8,0 %). V kategoriji molekularne funkcije je bilo največ vlog (45,0 %) pripisanih procesom vezave, sledila je transportna aktivnost z 32,0 % ter v nižjih odstotkih še katalitska aktivnost (18,0 %). Na ravni celičnih komponent je bilo največ markerjev EST-SSR (52,6 %) povezanih z znotrajceličnimi strukturami, v nižjih odstotkih so sledile vloge, pripisane membranskim celičnim strukturam (21,1 %) (Slika 17).

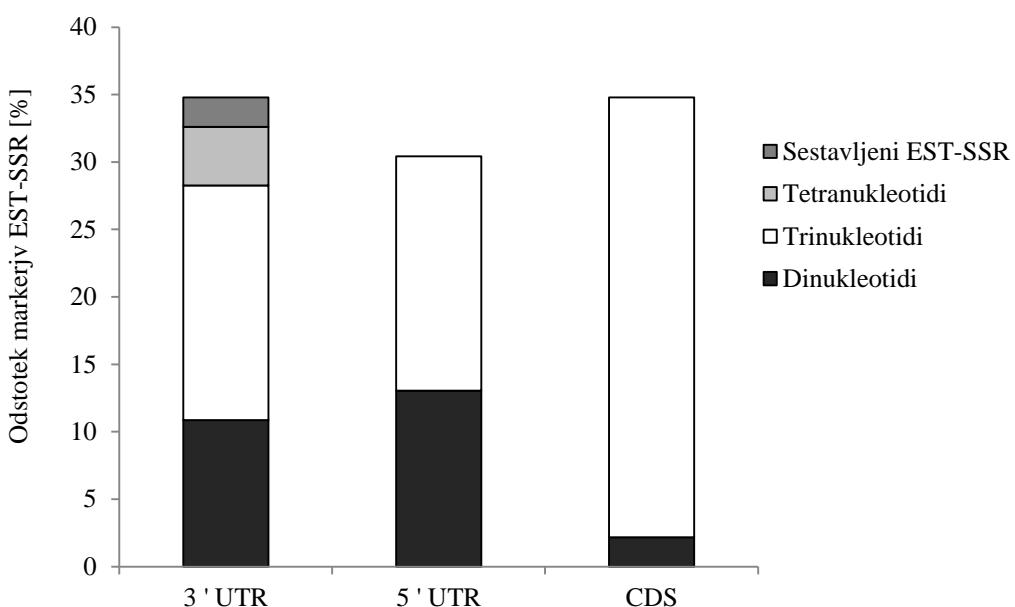


Slika 17: Funkcijnska analiza 46 markerjev EST-SSR oljke z uporabo programskega paketa Blast2GO  
Figure 17: Functional analysis of 46 EST-SSR markers in olive based on Blast2GO analysis

Na novo razvitim in anotiranim markerjem EST-SSR so bile pripisane vloge, povezane:

- z biosintezo lipidov (OeUP-16),
- s celičnim odgovorom na oksidativni stres (OeUP-23 in OeUP-25) in osmotski stres (OeUP-25),
- s celičnim transportom (OeUP-01, OeUP-07, OeUP-30 in OeUP-42),
- z rastjo pelodne cevke (OeUP-15),
- z regulacijo kalitve semena (OeUP-31),
- z razvojem embrija (OeUP-09 in OeUP-17) in postembrionalnim razvojem (OeUP-06).

Vseh 46 novih markerjev EST-SSR smo razvrstili tudi glede na lego mikrosatelitskega motiva znotraj gena, to je v kodirajočem delu zaporedja (CDS), v 3' nekodirajoči regiji (3' UTR) ali v 5' nekodirajoči regiji (5' UTR) (Slika 18).



**Slika 18:** Odstotek markerjev EST-SSR v določeni regiji gena (nekodirajoča UTR/kodirajoča CDS)  
**Figure 18:** EST-SSR frequencies according to estimated location (uncoding UTR/coding CDS)

Več kot polovica razvitih markerjev EST-SSR (65,2 %) se je nahajala v nekodirajoči regiji zaporedja (34,8 % v 3' nekodirajoči regiji UTR, 30,4 % v 5' nekodirajoči regiji UTR), med tem ko so bili ostali markerji (34,8 %) locirani znotraj kodirajočega zaporedja DNA (CDS) (Preglednica 3). Glede na dolžino osnovnega motiva mikrosatelita so v nekodirajoči regiji UTR prevladovali trinukleotidi (34,8 %), sledili so dinukleotidi (23,9 %) in tetranukleotidi (4,3 %). V nekodirajoči regiji UTR je bil identificiran samo en sestavljen mikrosatelist (2,2 %). V kodirajoči regiji CDS je bil odkrit samo en dinukleotid (2,2 %), vsi ostali

mikrosateliti so bili trinukleotidi, saj le v tem primeru sprememba v številu ponovitev mikrosatelitskega motiva ne vpliva na odprt bralni okvir<sup>54</sup> (Slika 18).

#### 4.4 PRIMERJAVA NOVIH MARKERJEV EST-SSR Z GENOMSKIMI MIKROSATELITI OLJKE

##### 4.4.1 Primerjava parametrov variabilnosti genskih in genomskeh mikrosatelitov oljke

Vseh 46 novih markerjev EST-SSR in 15 genomskeh markerjev SSR smo primerjali glede njihove uporabnosti za odkrivanje polimorfizma in genetske variabilnosti 24 oljčnih sort.

Vsi izračunani parametri genetske variabilnosti 46 markerjev EST-SSR 24-ih oljčnih sort so predstavljeni v preglednici 5. Z vsemi pari lokusno specifičnih začetnih oligonukleotidov smo pri analiziranih sortah oljk pomnožili 205 polimorfnih alelov. V povprečju se je na mikrosatelitski lokus pomnožilo 4,5 alelov. Na posameznih lokusih smo odkrili od dva (OeUP-10, OeUP-12, OeUP-17, OeUP-23, OeUP-25, OeUP-41, OeUP-46) do osem (OeUP-22 in OeUP-34) alelov. Ker je informacijska vrednost lokusa odvisna tudi od frekvence alelov, smo izračunali še število efektivnih alelov. V našem primeru se je število efektivnih alelov razlikovalo od dejanskega števila pomnoženih alelov in v povprečju znašalo 3,13 na lokus (Preglednica 5).

Iz preglednice 5 je razvidno, da so se vrednosti dejanske heterozigotnosti ( $H_o$ ) nahajale na območju med 0,042 za lokusa OeUP-12 in OeUP-43 ter vrednostjo 1,000 za lokus OeUP-22. Povprečje dejanske heterozigotnosti je bilo 0,649. Pričakovana heterozigotnost ( $H_e$ ) se je gibala med 0,042 za lokus OeUP-12 in 0,869 za lokus OeUP-22, in je v povprečju znašala 0,604. Vrednosti PIC (informacijska vrednost polimorfizma), ki kažejo na informativnost posameznega lokusa, so se nahajale med 0,040 (OeUP-12) in 0,833 (OeUP-22) in so v povprečju znašale 0,539. Kar 30 novih markerjev EST-SSR je imelo vrednosti PIC večje od 0,5, zato so se uvrstili med informativne lokuse. Lokusi z vrednostjo PIC nad 0,7 pa so se izkazali kor primerni za gensko kartiranje. V naši analizi smo odkrili 9 takih mikrosatelitskih lokusov. Verjetnost enakosti genotipov (PI) nam prav tako pokaže, kakšna je informativnost proučevanega lokusa. Višje vrednosti PI kažejo nizko informativnost lokusa. Verjetnost enakosti genotipov je bila najnižja pri lokusu OeUP-22 (PI=0,076) in najvišja pri lokusu OeUP-12 (PI=0,922), med tem ko je skupna vrednost PI za vse lokuse znašala  $2,10 \times 10^{-24}$  (Preglednica 5).

---

<sup>54</sup> Ang. Open reading frame

**Preglednica 5:** Parametri genetske variabilnosti posameznih markerjev EST-SSR pri 24 oljčnih sortah. Dejanska ( $H_o$ ) in pričakovana ( $H_e$ ) heterozigotnost, število alelov (n), število efektivnih alelov ( $n_e$ ), informacijska vrednost polimorfizma (PIC), verjetnost enakosti genotipov (PI), verjetnost odstopanja od Hardy-Weinbergovega ravnovesja (P-vrednost), frekvenca ničnih alelov (F(null))

**Table 5:** Parameters of genetic variability of each EST-SSR obtained among 24 olive varieties. Observed ( $H_o$ ) and expected ( $H_e$ ) heterozygosity, number of alleles (n), effective number of alleles ( $n_e$ ), polymorphic information content (PIC), probability of identity (PI), probability for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (P-value), estimated frequency of null alleles (F(null))

Lokus	$H_o$	$H_e$	n	$n_e$	PIC	PI	P-vrednost	F(null)
<b>OeUP-01</b>	0,833	0,811	6	5,29	<b>0,764</b>	0,132	0,5507 <sup>NS</sup>	-0,0235
<b>OeUP-02</b>	0,833	0,748	6	3,97	<b>0,686</b>	0,212	0,3597 <sup>NS</sup>	-0,0689
<b>OeUP-03</b>	0,958	0,563	3	2,29	0,454	0,494	0,0002***	-0,2870
<b>OeUP-04</b>	0,875	0,824	7	5,68	<b>0,780</b>	0,120	0,4429 <sup>NS</sup>	-0,0376
<b>OeUP-05</b>	0,583	0,593	4	2,46	<b>0,539</b>	0,300	0,0515 <sup>NS</sup>	+0,0299
<b>OeUP-06</b>	0,958	0,785	6	4,65	<b>0,730</b>	0,169	0,2551 <sup>NS</sup>	-0,1171
<b>OeUP-07</b>	0,208	0,696	7	3,29	<b>0,638</b>	0,231	0,0000***	+0,5433
<b>OeUP-08</b>	0,708	0,629	4	2,70	<b>0,571</b>	0,283	0,5822 <sup>NS</sup>	-0,0636
<b>OeUP-09</b>	0,958	0,792	5	4,81	<b>0,740</b>	0,157	0,2284 <sup>NS</sup>	-0,1079
<b>OeUP-10</b>	0,583	0,507	2	2,03	0,373	0,623	0,4516 <sup>NS</sup>	-0,0804
<b>OeUP-11</b>	0,875	0,717	7	3,53	<b>0,654</b>	0,233	0,3174 <sup>NS</sup>	-0,1197
<b>OeUP-12</b>	0,042	0,042	2	1,04	0,040	0,922	1,0000 <sup>NS</sup>	-0,0036
<b>OeUP-13</b>	0,667	0,637	3	2,75	<b>0,553</b>	0,353	0,5146 <sup>NS</sup>	-0,0270
<b>OeUP-14</b>	0,500	0,684	4	3,16	<b>0,609</b>	0,289	0,3739 <sup>NS</sup>	+0,1570
<b>OeUP-15</b>	0,208	0,407	3	1,69	0,354	0,495	0,0001***	+0,3294
<b>OeUP-16</b>	0,958	0,792	6	4,81	<b>0,741</b>	0,152	0,7158 <sup>NS</sup>	-0,1096
<b>OeUP-17</b>	0,167	0,156	2	1,18	0,141	0,753	0,7025 <sup>NS</sup>	-0,0358
<b>OeUP-18</b>	0,875	0,737	4	3,80	<b>0,668</b>	0,238	0,4240 <sup>NS</sup>	-0,0977
<b>OeUP-19</b>	0,875	0,658	4	2,92	<b>0,594</b>	0,276	0,0819 <sup>NS</sup>	-0,1783
<b>OeUP-20</b>	0,875	0,738	6	3,82	<b>0,673</b>	0,226	0,1835 <sup>NS</sup>	-0,1068
<b>OeUP-21</b>	0,792	0,701	4	3,34	<b>0,628</b>	0,274	0,4591 <sup>NS</sup>	-0,0670
<b>OeUP-22</b>	1,000	0,869	8	7,63	<b>0,833</b>	0,076	0,3407 <sup>NS</sup>	-0,0823

Se nadaljuje.

**Nadaljevanje preglednice 5:** Parametri genetske variabilnosti posameznih markerjev EST-SSR pri 24 oljčnih sortah

**Continuing table 5:** Parameters of genetic variability of each EST-SSR obtained among 24 olive varieties

Lokus	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	n	n <sub>e</sub>	PIC	PI	P-vrednost	F(null)
<b>OeUP-23</b>	0,500	0,383	2	1,62	0,305	0,602	0,1205 <sup>NS</sup>	-0,1423
<b>OeUP-24</b>	0,958	0,780	6	4,55	<b>0,731</b>	0,155	0,0586 <sup>NS</sup>	-0,1223
<b>OeUP-25</b>	0,125	0,488	2	1,95	0,364	0,615	0,0001***	+0,5856
<b>OeUP-26</b>	0,875	0,667	5	3,00	<b>0,589</b>	0,313	0,4038 <sup>NS</sup>	-0,1633
<b>OeUP-27</b>	0,958	0,664	5	2,98	<b>0,585</b>	0,318	0,0466*	-0,2089
<b>OeUP-28</b>	0,333	0,489	5	1,96	0,433	0,409	0,0002***	+0,1823
<b>OeUP-29</b>	0,917	0,660	4	2,94	<b>0,577</b>	0,334	0,0581 <sup>NS</sup>	-0,1840
<b>OeUP-30</b>	0,792	0,611	3	2,57	<b>0,514</b>	0,414	0,2565 <sup>NS</sup>	-0,1470
<b>OeUP-31</b>	0,417	0,391	4	1,64	0,355	0,464	0,9763 <sup>NS</sup>	-0,0349
<b>OeUP-32</b>	0,625	0,595	3	2,47	<b>0,514</b>	0,379	0,4851 <sup>NS</sup>	-0,0194
<b>OeUP-33</b>	0,167	0,515	4	2,06	0,458	0,386	0,0000***	+0,4955
<b>OeUP-34</b>	0,958	0,860	8	7,14	<b>0,823</b>	0,083	0,0619 <sup>NS</sup>	-0,0692
<b>OeUP-35</b>	0,542	0,414	3	1,71	0,338	0,554	0,3892 <sup>NS</sup>	-0,1522
<b>OeUP-36</b>	0,292	0,263	3	1,36	0,239	0,606	0,8989 <sup>NS</sup>	-0,0723
<b>OeUP-37</b>	0,958	0,848	7	6,58	<b>0,808</b>	0,095	0,3292 <sup>NS</sup>	-0,0725
<b>OeUP-38</b>	0,667	0,639	5	2,77	<b>0,553</b>	0,359	0,0000***	-0,0610
<b>OeUP-39</b>	0,833	0,735	6	3,77	<b>0,669</b>	0,230	0,1459 <sup>NS</sup>	-0,0780
<b>OeUP-40</b>	0,667	0,655	4	2,90	<b>0,590</b>	0,283	0,4966 <sup>NS</sup>	-0,0229
<b>OeUP-41</b>	0,292	0,510	2	2,04	0,375	0,625	0,0322*	+0,2623
<b>OeUP-42</b>	0,542	0,576	6	2,36	<b>0,528</b>	0,299	0,5137 <sup>NS</sup>	+0,0596
<b>OeUP-43</b>	0,042	0,299	4	1,43	0,274	0,555	0,0000***	+0,7658
<b>OeUP-44</b>	0,583	0,504	3	2,02	0,391	0,565	0,4816 <sup>NS</sup>	-0,0788
<b>OeUP-45</b>	0,875	0,730	6	3,70	<b>0,671</b>	0,213	0,5332 <sup>NS</sup>	-0,1208
<b>OeUP-46</b>	0,625	0,439	2	1,78	0,337	0,602	0,0324*	-0,1850
<b>Povprečje</b>	0,649	0,604	4,5	3,13	0,539	$2,10 \times 10^{-24a}$	-	-

<sup>a</sup>Zmnožek vrednosti PI vseh 46 lokusov EST-SSR. NS<sup>55</sup> - ni statistično značilne razlike. \* - statistično značilna razlika P<0,05. \*\* - statistično značilna razlika P<0,01. \*\*\* - statistično značilna razlika P<0,001.

<sup>55</sup> Ang. Not significant

Število različnih genotipov, ki smo jih opazili na posameznem lokusu EST-SSR, se je gibalo med 2 (OeUP-12, OeUP-17, OeUP-23, OeUP-46) in 14 (OeUP-01, OeUP-22). Skupaj pa je bilo odkritih 311 različnih genotipov, kar predstavlja 48,5 % vseh teoretično možnih genotipov (641). Med vsemi opaženimi genotipi je bilo kar 114 edinstvenih, značilnih samo za določeno oljčno sorto. Največ edinstvenih genotipov smo odkrili na lokusu OeUP-01 (9), sledil mu je lokus OeUP-16 (8) in nato še lokus OeUP-34 (7).

Nove markerje EST-SSR smo primerjali z genomske mikrosateliti oljke. V preglednici 6 so predstavljeni vsi izračunani parametri genetske variabilnosti posameznih genomskega markerjev SSR pri 24 oljčnih sortah. S 15 pari lokusno specifičnih začetnih oligonukleotidov smo pri 24 sortah oljk pomnožili 102 polimorfna alela. Najmanj alelov (4) smo odkrili na lokusu DCA5, največ (11) pa na lokusu DCA9. V povprečju se je na mikrosatelitski lokus pomnožilo 6,8 alelov. Izračunali smo tudi število efektivnih alelov, ki se je v našem primeru razlikovalo od dejanskega števila pomnoženih alelov in je v povprečju znašalo 4,05 na lokus.

Vrednosti dejanske heterozigotnosti so se gibale med 0,630 za lokusa DCA5 in UDO99-19 in vrednostjo 1,000 za lokusa DCA11, GAPU101 ter GAPU103A. Z izjemo lokusa DCA7, je bila dejanska heterozigotnost na vseh ostalih lokusih višja od pričakovane. Povprečje dejanske heterozigotnosti je znašalo 0,854 in je bilo prav tako višje od povprečja pričakovane heterozigotnosti ( $H_e=0,729$ ). Vrednosti pričakovane heterozigotnosti so se nahajale na območju med 0,502 za lokus DCA5 in 0,857 za lokus DCA16. Informacijska vrednost polimorfizma (PIC) je bila najvišja pri lokusu DCA16 (PIC=0,822), najnižja pa pri lokusu DCA5 (PIC=0,457). Vsi lokusi, razen lokusa DCA5, so se uvrstili med informativne lokuse, ker so imeli vrednost PIC večjo od 0,5. Ker se vrednost PIC uporablja tudi kot merilo primernosti lokusa za gensko kartiranje, lahko zaključimo, da je bilo v našem primeru 8 takih lokusov (PIC<0,7). Verjetnost enakosti genotipov (PI) je bila najvišja pri lokusu DCA15 (PI=0,406), sledili so mu lokusi DCA5 (PI=0,364), UDO99-19 (PI=0,306), EMO90 (PI=0,306), GAPU71B (PI=0,266), GAPU103A (PI=0,244) in EMO3 (PI=0,206), kar kaže na nižjo informativnost teh lokusov. Večjo sposobnost razločevanja posameznikov lahko glede na najnižje vrednosti PI pričakujemo na lokusih DCA11 (PI=0,112), DCA3 (PI=0,106), GAPU101 (PI=0,090) in DCA16 (PI=0,081) (Preglednica 6).

Število različnih genotipov, ki smo jih opazili na posameznem genomskem lokusu SSR, se je gibalo med 4 (DCA5) in 16 (DCA9). Skupaj pa je bilo odkritih 145 različnih genotipov, kar predstavlja 33,5 % vseh teoretično možnih genotipov (433). Med vsemi opaženimi genotipi je bilo kar 56 edinstvenih, značilnih samo za določeno oljčno sorto. Največ edinstvenih genotipov (8) smo odkrili na lokusih DCA16 in EMO90, sledila sta jima lokusa DCA14 in EMO3 (7).

**Preglednica 6:** Parametri genetske variabilnosti posameznih genomskega markerjev SSR pri 24 oljčnih sortah. Dejanska ( $H_o$ ) in pričakovana ( $H_e$ ) heterozigotnost, število alelov (n), število efektivnih alelov ( $n_e$ ), informacijska vrednost polimorfizma (PIC), verjetnost enakosti genotipov (PI), verjetnost odstopanja od Hardy-Weinbergovega ravnovesja (P-vrednost), frekvenca ničnih alelov (F(null))

**Table 6:** Parameters of genetic variability of each genomic SSR obtained among 24 olive varieties. Observed ( $H_o$ ) and expected ( $H_e$ ) heterozygosity, number of alleles (n), effective number of alleles ( $n_e$ ), polymorphic information content (PIC), probability of identity (PI), probability for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (P-value), estimated frequency of null alleles (F(null))

Lokus	$H_o$	$H_e$	n	$n_e$	PIC	PI	P-vrednost	F(null)
<b>ssrOeUA-DCA3</b>	0,963	0,837	7	5,61	<b>0,797</b>	0,106	0,4302 <sup>NS</sup>	-0,0805
<b>ssrOeUA-DCA5</b>	0,630	0,502	4	1,97	0,457	0,364	0,5048 <sup>NS</sup>	-0,1631
<b>ssrOeUA-DCA7</b>	0,741	0,820	7	5,13	<b>0,777</b>	0,122	0,0000***	+0,0384
<b>ssrOeUA-DCA9</b>	0,889	0,839	11	5,65	<b>0,801</b>	0,098	0,9864 <sup>NS</sup>	-0,0387
<b>ssrOeUA-DCA11</b>	1,000	0,826	10	5,28	<b>0,785</b>	0,112	0,5953 <sup>NS</sup>	-0,1104
<b>ssrOeUA-DCA14</b>	0,889	0,753	8	3,84	<b>0,707</b>	0,166	0,0000***	-0,0993
<b>ssrOeUA-DCA15</b>	0,741	0,595	3	2,40	<b>0,506</b>	0,406	0,3664NS	-0,1205
<b>ssrOeUA-DCA16</b>	0,926	0,857	9	6,28	<b>0,822</b>	0,081	0,0359*	-0,0473
<b>ssrOeUA-DCA18</b>	0,926	0,771	8	4,11	<b>0,727</b>	0,148	0,2488NS	-0,1125
<b>UDO99-19</b>	0,630	0,569	5	2,26	<b>0,521</b>	0,306	0,4508NS	-0,0577
<b>EMO03</b>	0,852	0,724	6	3,46	<b>0,670</b>	0,206	0,3471NS	-0,0929
<b>EMO90</b>	0,778	0,598	5	2,42	<b>0,542</b>	0,306	0,2082 NS	-0,1736
<b>GAPU71B</b>	0,852	0,695	6	3,14	<b>0,627</b>	0,266	0,6164NS	-0,1199
<b>GAPU101</b>	1,000	0,848	8	5,95	<b>0,811</b>	0,090	0,0659 NS	-0,0969
<b>GAPU103A</b>	1,000	0,697	5	3,17	<b>0,636</b>	0,244	0,0167*	-0,2231
<b>Povprečje</b>	0,854	0,729	6,8	4,05	<b>0,679</b>	$4,71 \times 10^{-12a}$	-	-

<sup>a</sup>Zmnožek vrednosti PI vseh 15 genomskih lokusov SSR. NS - ni statistično značilne razlike. \* - statistično značilna razlika P<0,05. \*\* - statistično značilna razlika P<0,01. \*\*\* - statistično značilna razlika P<0,001.

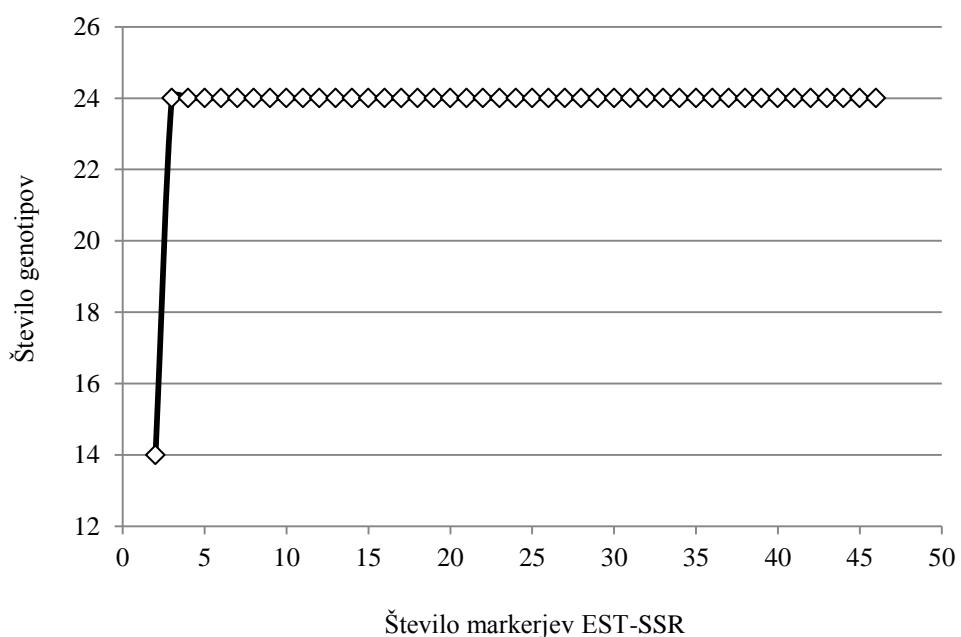
#### 4.4.2 Primerjava genskih in genomskega mikrosatelitov pri proučevanju sorodnostnih odnosov oljčnih sort in pri upravljanju kolekcij oljk

Set 46 novih markerjev EST-SSR in 15 genskih markerjev SSR smo testirali glede primernosti za proučevanje sorodnostnih odnosov oljčnih sort in posledično glede uporabnosti pri upravljanju nacionalnih koleksijskih nasadov oljk. Od vseh 46 analiziranih lokusov EST-SSR, je imelo 11 lokusov statistično značilno odstopanje od Hardy-Weinbergovega ravnovesja (Preglednica 5). Poleg tega je bila na devetih lokusih

dejanska heterozigotnost nižja od pričakovane heterozigotnosti. Šest lokusov je imelo frekvenco ničnih alelov večjo od vrednosti 0,2, ki označuje zgornjo mejo, pod katero naj bi bil pojav mikrosatelitskih ničnih alelov neobičajen oz. redek (Dakin in Avise, 2004). V naši raziskavi je odstopanje pri večini primerov posledica: (a) presežka ene vrste homozigota (redkeje dveh vrst homozigotov) na analiziranem lokusu in (b) presežka ene kombinacije identičnih alelov, opažene pri večini oljčnih sort.

Med 205 pomnoženimi polimorfnimi aleli smo odkrili 29 sortno specifičnih alelov. Po en specifičen alel so imele sorte 'Črnica', 'Leccio del Corno', 'Maurino', 'Santa Caterina', 'Štorta' in 'Zelenjak'. Dva specifična alela smo odkrili pri sortah 'Arbequina', 'Athena' in 'Coratina'. Trije specifični aleli so bili karakteristični le za sorto Picholine', in prav tako so bili štirje specifični aleli le pri sorti 'Moraiolo'. Za sorte 'Itrska belica' in 'Cipressino' pa je bilo značilnih kar pet specifičnih alelov.

Alelni polimorfizem omogoča razlikovanje vseh analiziranih oljčnih sort. Z markerji EST-SSR smo analizirali 24 sort oljk in odkrili 24 različnih genotipov. S pomočjo programske skripte AMACAIID smo izračunali minimalno število markerjev, ki so potrebni za razlikovanje vseh različnih genotipov v našem vzorcu. Izkazalo se je, da lahko vseh 24 genotipov oljk ločimo že z dvema lokusoma EST-SSR (OeUP-04 in OeUP-14) (Slika 19).



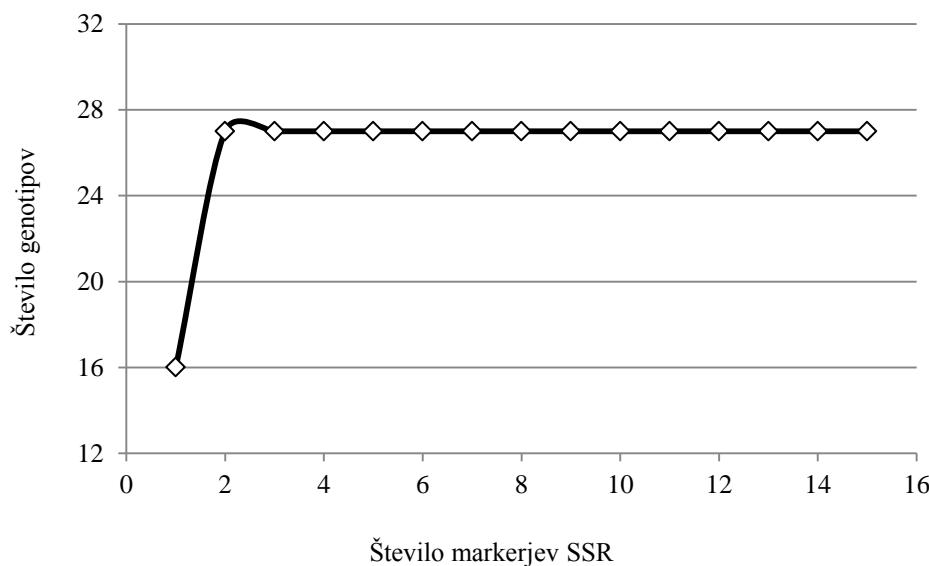
**Slika 19:** Razlikovanje števila genotipov glede na število lokusov ESR-SSR  
**Figure 19:** Number of discriminated genotypes according to the number of EST-SSR loci

Od vseh 15 analiziranih genomskeh lokusov SSR, smo pri štirih lokusih (DCA7, DCA14, DCA16 in GAPU103A) ugotovili statistično značilno odstopanje od

Hardy-Weinbergovega ravnovesja (Preglednica 6). Poleg tega je bila pri lokusu DCA7 dejanska heterozigotnost nižja od pričakovane heterozigotnosti, lokus GAPU103A pa je imel frekvenco ničnih alelov večjo od vrednosti 0,2, ki je predlagana kot zgornja meja. Pri lokusu DCA7 gre za presežek več vrst homozigotov, med tem ko pri lokusu GAPU103A pri večini oljčnih sort prevladuje ena kombinacija identičnih alelov.

Med vsemi (102) pomnoženimi polimorfnimi aleli je bilo 21 sortno specifičnih alelov. Po en specifičen alel smo odkrili pri sortah ‘Ascolana tenera’, ‘Buga’, ‘Grignan’, ‘Istrska belica’, ‘Itrana’, ‘Leccione’, ‘Nocellara del Belice’. Dva specifična alela je imela sorta ‘Coratina’, tri specifične alele sorte ‘Athena’ in štiri specifične alele sorte ‘Moraiolo’. Pet specifičnih alelov pa je bilo karakterističnih za sorto ‘Cipressino’.

Tudi z genomskeimi mikrosateliti smo analizirali 24 sort oljk, a v tem primeru odkrili 27 različnih genotipov. S pomočjo programske skripte AMaCAID smo izračunali minimalno število markerjev, ki so omogočili razlikovanje vseh identificiranih genotipov. Iz Slike 20 je razvidno, da smo vseh 27 različnih genotipov oljk lahko ločili že z dvema (DCA9 in DCA11) genomskeima mikrosatelitskima lokusoma. Za lokus DCA11 je znana nestabilna struktura mikrosatelistkega motiva (Sefc in sod., 2000), poleg tega pa tudi ni uvrščen na seznam priporočenih mikrosatelitskih markerjev oljke (Baldoni in sod., 2009). Zaradi tega smo ga izločili iz naših rezultatov in s programsko skripto AMaCAID ponovili analizo. Izkazalo se je, da lahko vseh 27 različnih genotipov oljk ločimo s tremi lokusi (DCA9, DCA16 in DCA18).

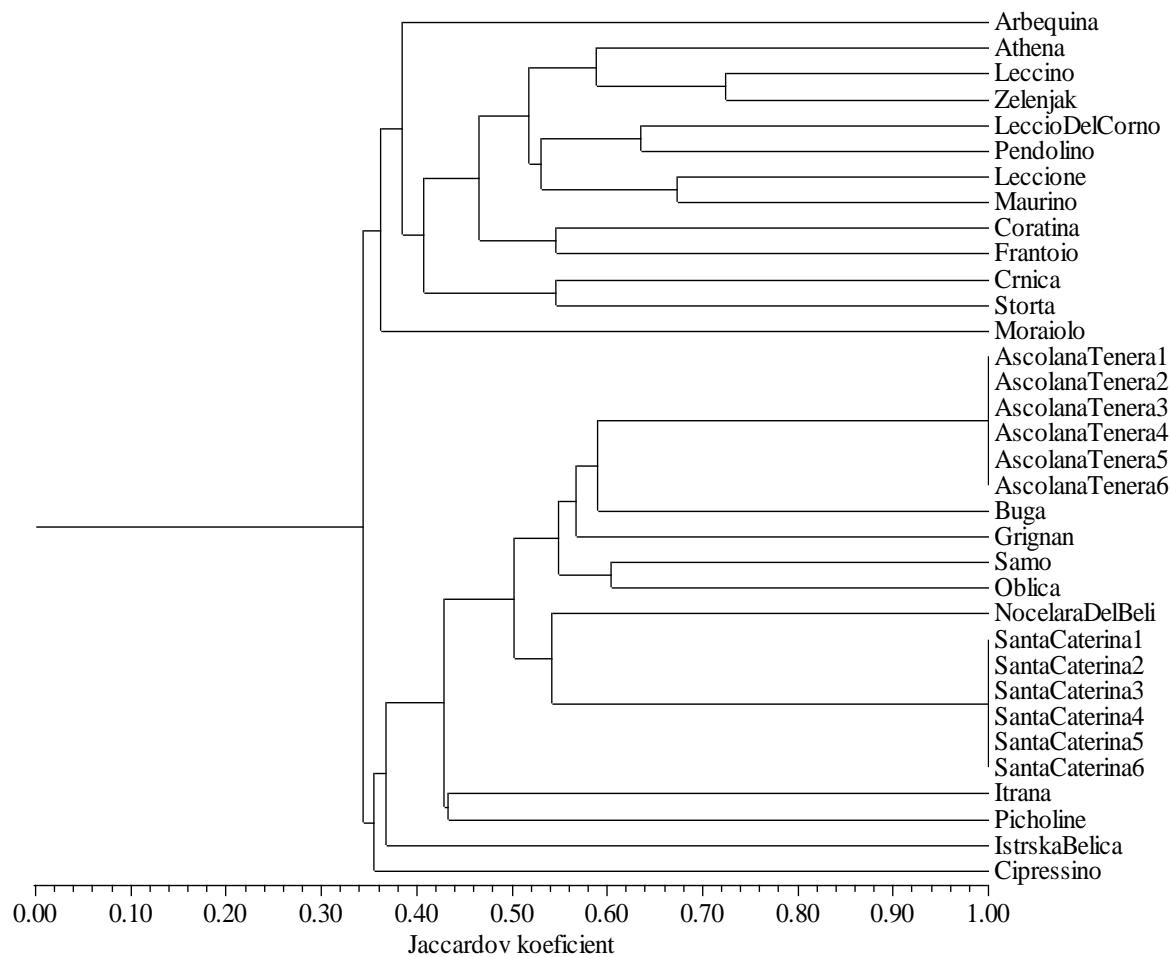


**Slika 20:** Razlikovanje števila genotipov glede na število lokusov SSR  
**Figure 20:** Number of discriminated genotypes according to the number of SSR loci

Za genske in genomske mikrosatelitske markerje smo iz podatkov prisotnosti (1) ali odsotnosti (0) določenega alela pri posameznem genotipu oljke izdelali binarni matriki, ki sta nam služili kot osnova za izračunavanje Jaccardovih koeficientov podobnosti med analiziranimi vzorci oljk. Iz Jaccardovih matrik podobnostnih koeficientov smo z metodo UPGMA izdelali dendrogram (sorodnostno drevo) EST-SSR, ki je temeljil na rezultatih genotipizacije z genskimi mikrosatelitskimi markerji, in dendrogram SSR, ki je temeljil na rezultatih genotipizacije z genomskega mikrosatelitskimi markerji. V obeh dendrogramih so bila vzorčna drevesa razvrščena v sorodnostne skupine. Primernost uporabljene metode UPGMA smo preverili z izračunom kofenetičnih vrednosti sorodnostnih skupin, ki smo jih primerjali z vrednostmi Jaccardovih koeficientov v osnovni matriki.

Pri genskih markerjih EST-SSR je izračunan korelacijski koeficient med kofenetičnimi in Jaccardovimi vrednostmi znašal 0,84. To pomeni, da gre za dobro ujemanje izvornih podatkov podobnosti z razporeditvijo v sorodnostne skupine. Pri markerjih EST-SSR smo najvišjo vrednost Jaccardovega koeficiente opazili med sortama 'Leccino' in 'Zelenjak' (0,72). Povprečni koeficient podobnosti je bil relativno nizek (0,39).

V dendrogramu EST-SSR se je jasno ločila skupina, v katero so se razvrstile toskanske oljčne sorte, ki se jih goji za pridobivanje oljčnega olja ('Leccino', 'Leccio del Corno', 'Pendolino', 'Leccione', 'Maurino', 'Frantio'). V skupino toskanskih sort pa se je vključila še italijanska sorta 'Coratina' ter sorte 'Athena' in 'Zelenjak', za kateri se predvideva, da sta bili na obalo severnega Jadranu prinešeni iz osrednje Italije, kar so pokazale že prehodne raziskave (Bandelj in sod., 2004). Toskanskim sortam sta genetsko podobni še 'Črnica', ki se jo goji za pridobivanje oljčnega olja ter 'Štorta', ki se jo goji za namizne oljke, obe pa veljata za slovenski oljčni sorte. Drugo dobro definirano skupino predstavljajo sorte 'Ascolana tenera', 'Grignan', 'Buga', 'Samo' in 'Oblica', ki jim je skupnih kar 60 % alelov, poleg tega pa sta 'Samo' in 'Buga' slovenski lokalni sorte. Sorte 'Arbequina', 'Cipressino', 'Itrska belica' in 'Moraiolo' so ločene od ostalih sort v dendrogramu. Pri teh sortah smo namreč odkrili tudi dva ali več sortno specifičnih alelov (Slika 21).

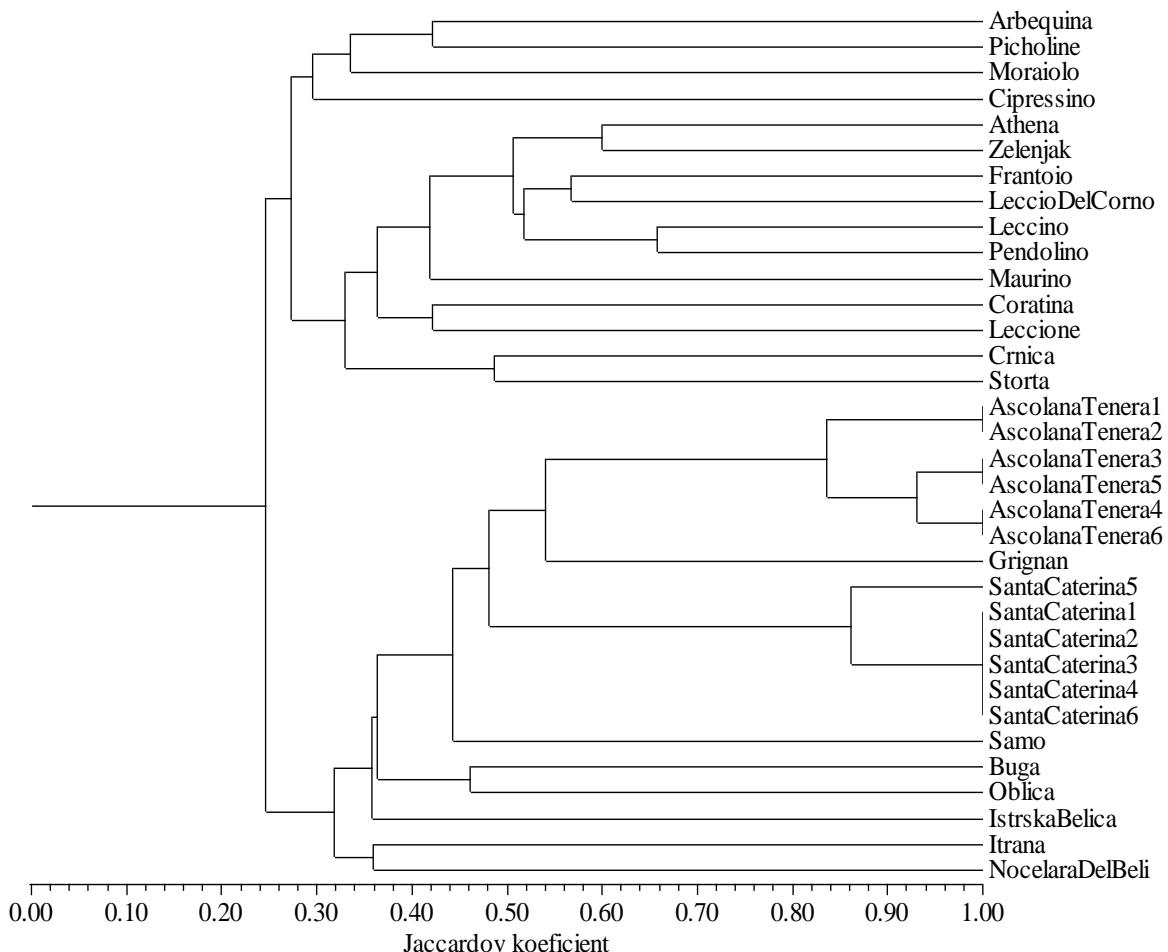


**Slika 21:** Dendrogram UPGMA, izdelan na osnovi markerjev EST-SSR in izračunu Jaccardovih koeficientov podobnosti vseh identificiranih genotipov oljk  
**Figure 21:** UPGMA dendograms constructed from EST-SSRs and Jaccard's coefficient of genetic similarity among 24 olive varieties

Izračunan korelacijski koeficient med kofenetičnimi in Jaccardovimi vrednostmi je pri genomskeh mikrosatelitih znašal 0,81, kar pomeni, da gre tudi v primeru genomskeh markerjev za dobro ujemanje izvornih podatkov podobnosti z razporeditvijo v sorodnostne skupine. Pri genomskeh markerjih SSR smo najvišjo vrednost Jaccardovega koeficiente opazili med sortama 'Leccino' in 'Pendolino' (0,86). Povprečni koeficient podobnosti je bil relativno visok (0,70). (Slika 22).

Tudi v dendrogramu SSR so se, razen sorte 'Leccione', v prvo skupino razvrstile vse toskanske sorte. V skupino toskanskih sort sta se vključili še sorte 'Athena' in 'Zelenjak' ter sorte 'Črnica' in 'Štorta'. Drugo skupino sestavljajo debeloplodne sorte, 'Ascolana tenera', 'Samo' in 'Santa Caterina', ki se jih uporablja za vlaganje. V drugo skupino se je uvrstila tudi sorta 'Grignan', ki se jo zaradi zelo drobnih plodov uporablja izključno za

pridobivanje oljčnega olja. Drugi skupini sta se z nižjimi podobnostnimi vrednostmi pridružili še sorte 'Buga' in 'Oblica'.



**Slika 22:** Dendrogram UPGMA, izdelan na osnovi genomskega markerja SSR in izračunu Jaccardovih koeficientov podobnosti vseh identificiranih genotipov oljk

**Figure 22:** UPGMA dendograms constructed from SSRs data and Jaccard's coefficient of genetic similarity among 24 olive varieties

Poleg tega smo z genomskega markerja SSR opazili genetske razlike znotraj sorte 'Ascolana tenera' in znotraj sorte 'Santa Caterina'. Pri sorti 'Ascolana tenera' smo ugotovili dva različna genotipa na lokusih DCA9 in DCA11, pri sorti 'Santa Caterina' pa smo dva različna genotipa ugotovili na lokusu DCA11, kar je lahko posledica mutacij na teh dveh lokusih ali poliklonskega značaja oljk. Tudi v primeru genomskega merkerja SSR so sorte 'Arbequina', 'Cipressino', 'Itrska belica', 'Leccione', 'Moraiolo', 'Nocellara del Belice' in 'Picholine' ločene od ostalih sort v dendrogramu. Z izjemo sorte 'Arbequina' in 'Picholine' smo tudi pri teh sortah odkrili enega ali več sortno specifičnih alelov (Slika 22).

#### 4.5 IZDELAVA STARŠEVSKEGA TESTA Z NOVIMI MARKERJI EST-SSR IN DOLOČITEV NAJPOGOSTEJŠIH OPRAŠEVALNIH SORT ‘ISTRSKIE BELICE’

Za izdelavo starševskega testa ‘Istrske belice’ smo v vsakem proučevanem oljčniku (Osp in Strunjan) v letu 2012 in 2013 naključno vzorčili 120 plodov, ki so bili naravno opršeni. Ob pregledovanju embrijev se je izkazalo, da vsi niso bili primerni za izolacijo DNA. V letih 2012 in 2013 smo v Ospu zabeležili povprečno 31 % suhih oz. deformiranih embrijev, v Strunjanu pa povprečno 41,5 % suhih embrijev (Preglednica 7).

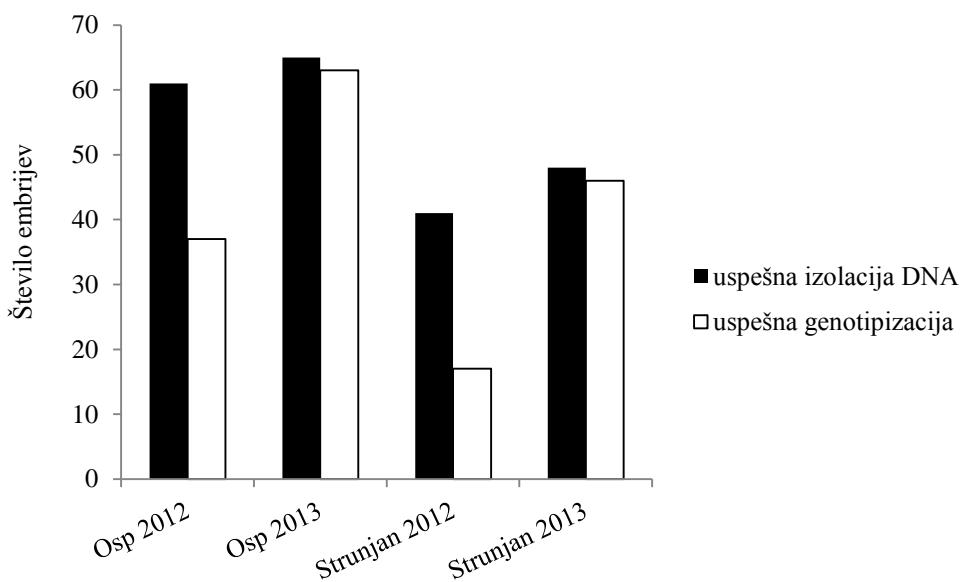
**Preglednica 7:** Število pregledanih oljčnih plodov, število suhih oz. deformiranih embrijev, število embrijev, kjer izolacija DNA ni bila uspešna ter število embrijev z uspešno izolirano DNA

**Table 7:** Number of examined olive fruits, number of dried or deformed embryos, number of embryos with unsuccessful and with successful DNA extraction

Merjeni parametri	OSP		STRUNJAN	
	2012	2013	2012	2013
Št. pregledanih plodov	120 (100 %)	120 (100 %)	120 (100 %)	120 (100 %)
Suhi/deformirani embriji	35 (29 %)	39 (33 %)	47 (39 %)	53 (44 %)
Neuspešna izolacija DNA	24 (20 %)	16 (13 %)	32 (27 %)	19 (16 %)
Uspešna izolacija DNA	61 (51 %)	65 (54 %)	41 (34 %)	48 (40 %)

Osnova za uspešen starševski test je zadostna koncentracija kakovostne DNA. To smo iz oljčnih embrijev uspeli izolirati po objavljenem protokolu (Guerin in Sedgley, 2007), ki smo ga malenkost spremenili. Izkazalo se je, da je bila izolacija DNA uspešnejša in koncentracije izolirane DNA bistveno višje, če smo čas precipitacije DNA v zamrzovalniku podaljšali iz 30 min na 1,5 ure (Baruca Arbeiter in sod., 2014). Kljub optimizaciji postopka se je v določenem odstotku primerov zgodilo, da izolacija DNA ni bila uspešna. To pomeni, da ob koncu izolacije na dnu centrifugirke sploh ni bila vidna usedlina DNA, ali pa je bila izmerjena koncentracija DNA prenizka za nadaljnje analize. V Ospu smo v obeh letih uspeli izolirati DNA iz povprečno 52 %, v Strunjanu pa iz povprečno 37 % vseh vzorčenih embrijev (Preglednica 7).

Sledilo je pomnoževanje DNA embrijev s sedmimi markerji EST-SSR, ki jih je odlikovalo veliko število alelov, visoka stopnja polimorfizma in nizke frekvence ničnih alelov. Nobeden od izbranih markerjev ni odstopal od Hardy-Weinbergovega ravnovesja. Iz slike 23 je razvidno, da uspešno izolirana DNA ne pomeni nujno uspešnega pomnoževanja v reakciji PCR. Določen odstotek embrijev je zaradi neuspešnega pomnoževanja DNA izpadel iz nadaljnje analize. Odstotek teh embrijev je bil v Ospu (39 %) in Strunjanu (59 %) bistveno višji leta 2012. Leta 2013 sta tako v Ospu kot v Strunjanu iz nadaljnje analize izpadla le dva vzorca embrijev. V obeh letih proučevanja smo v Ospu genotipizirali 100 vzorcev embrijev (2012=37; 2013=63) in v Strunjanu 63 vzorcev embrijev (2012=17; 2013=46).



**Slika 23:** Število embrijev, iz katerih je bila uspešno izolirana DNA ter število uspešno genotipiziranih embrijev

**Figure 23:** Number of embryos with successful DNA extraction and number of successfully genotyped embryos

V preglednici 8 so zbrani parametri genetske variabilnosti za vse uspešno pomnožene vzorce DNA embrijev ter 24 oljčnih sort, ki smo jih izbrali kot potencialne opaševalne sorte. Vrednosti statističnih parametrov se med letoma 2012 in 2013 na posamezni lokaciji niso bistveno razlikovale. V Ospu in Strunjanu sta bili povprečna dejanska ( $H_o$ ) in pričakovana ( $H_e$ ) heterozigotnost v letu 2012 nekoliko višji, med tem ko je bilo povprečno število pomnoženih alelov (n) ter povprečno število efektivnih alelov na lokus ( $n_e$ ) na obeh lokacijah nekoliko višje v letu 2013. V obeh koledarskih letih so bile povprečne vrednosti parametrov genetske variabilnosti višje v Strunjanu. Le v letu 2012 je bila v Ospu višja povprečna dejanska heterozigotnost. V letih 2012 in 2013 se je v Ospu pomnožilo povprečno 4,7 različnih alelov in število efektivnih alelov na lokus je v poprečju znašalo 3,13. V Strunjanu smo v obeh letih detektirali povprečno 5,3 različne alele, število efektivnih alelov na lokus pa je bilo v povprečju 3,65. Število pomnoženih alelov se je v Ospu gibalo med tri (OeUP-37) in šest (OeUP-22), v Strunjanu pa med tri (OeUP-05) in devet (OeUP-22). V letih 2012 in 2013 je bilo v Ospu največ heterozigotnih embrijev na lokusu OeUP-42 ( $H_{o,2012}=1,000/H_{o,2013}=0,984$ ), najmanj pa na lokusih OeUP-05 ( $H_{o,2012}=0,760$ ) oz. OeUP-21 ( $H_{o,2013}=0,712$ ). V Strunjanu je bilo v obeh letih najmanj heterozigotnih embrijev na lokusu OeUP-09 ( $H_{o,2012}=0,796/H_{o,2013}=0,659$ ).

**Preglednica 8:** Parametri genetske variabilnosti sedmih markerjev EST-SSR pri embrijih oljke v Ospu in Strunjanu v letih 2012 in 2013 ter pri 24 potencialnih opraševalnih oljčnih sortah. Dejanska ( $H_o$ ) in pričakovana ( $H_e$ ) heterozigotnost, število alelov (n), število efektivnih alelov ( $n_e$ ), informacijska vrednost polimorfizma (PIC), verjetnost enakosti genotipov (PI) in verjetnost izključitve (EP)

**Table 8:** Parameters of genetic variability of seven EST-SSR obtained among olive embryos in Osp and Strunjan, in 2012 and 2013, and among 24 potential pollinating olive varieties. Observed ( $H_o$ ) and expected ( $H_e$ ) heterozygosity, number of alleles (n), effective number of alleles ( $n_e$ ), polymorphic information content (PIC), probability of identity (PI) in exclusion probability (EP)

OSP								
	2012				2013			
Lokus	$H_o$	$H_e$	n	$n_e$	$H_o$	$H_e$	n	$n_e$
<b>OeUP-05</b>	0,760	0,696	4	3,14	0,889	0,697	4	3,24
<b>OeUP-09</b>	0,920	0,675	5	2,96	0,794	0,635	4	2,70
<b>OeUP-16</b>	0,897	0,745	5	3,73	0,730	0,652	5	2,83
<b>OeUP-21</b>	0,900	0,707	5	3,29	0,712	0,653	5	2,84
<b>OeUP-22</b>	0,770	0,627	5	2,65	0,967	0,785	6	4,50
<b>OeUP-37</b>	1,000	0,833	3	2,67	0,934	0,697	4	3,23
<b>OeUP-42</b>	1,000	0,695	5	3,14	0,984	0,652	5	2,83
<b>Povprečje/Vsota*</b>	0,892	0,711	4,6/32*	3,08/21,6*	0,859	0,682	4,7/33*	3,17/22,2*
STRUNJAN								
	2012				2013			
Lokus	$H_o$	$H_e$	n	$n_e$	$H_o$	$H_e$	n	$n_e$
<b>OeUP-05</b>	0,875	0,667	3	2,83	0,881	0,669	3	2,95
<b>OeUP-09</b>	0,796	0,714	4	3,19	0,659	0,697	5	3,21
<b>OeUP-16</b>	0,800	0,740	5	3,52	0,841	0,765	6	4,11
<b>OeUP-21</b>	0,800	0,699	4	3,01	0,850	0,706	4	3,30
<b>OeUP-22</b>	0,941	0,811	9	4,70	0,978	0,809	9	5,00
<b>OeUP-37</b>	0,882	0,790	6	4,28	0,870	0,768	6	4,15
<b>OeUP-42</b>	0,875	0,667	3	2,83	0,976	0,713	5	3,38
<b>Povprečje/Vsota*</b>	0,871	0,736	5,1/36*	3,56/24,9*	0,865	0,732	5,43/38*	3,73/26,1*
POTENCIJALNE OPRAŠEVALNE SORTE								
Lokus	$H_o$	$H_e$	n	$n_e$	PIC	PI	EP	/
<b>OeUP-05</b>	0,583	0,593	4	2,46	0,539	0,300	0,352	/
<b>OeUP-09</b>	0,958	0,792	5	4,81	0,740	0,157	0,560	/
<b>OeUP-16</b>	0,958	0,792	6	4,81	0,741	0,152	0,566	/
<b>OeUP-21</b>	0,792	0,701	4	3,34	0,628	0,274	0,420	/
<b>OeUP-22</b>	1,000	0,869	8	7,63	0,833	0,076	0,698	/
<b>OeUP-37</b>	0,958	0,848	7	6,58	0,808	0,095	0,660	/
<b>OeUP-42</b>	0,542	0,576	6	2,36	0,528	0,299	0,347	/
<b>Povprečje/Vsota*</b>	0,827	0,739	5,7/40*	4,57/32,0*	0,688	0,000**	0,998***	/

\*\*Zmnožek vrednosti PI vseh sedmih lokusov.

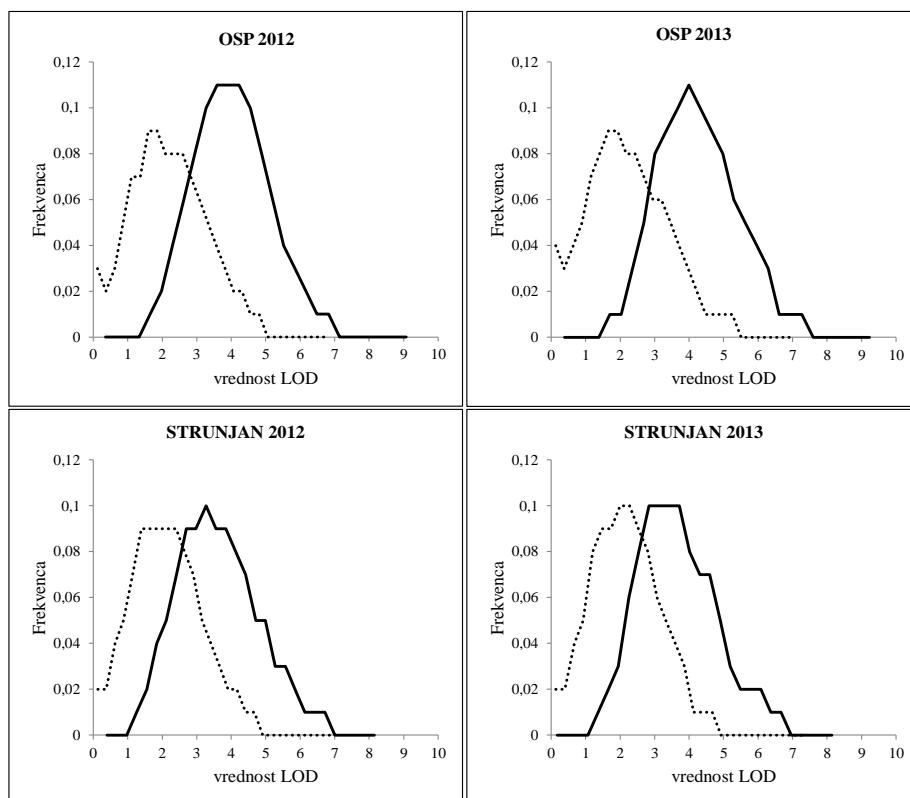
\*\*\*Kumulativna vrednost vseh sedmih lokusov.

V primerjavi z variabilnostjo lokusov pri embrijih so bili vsi analizirani lokusi EST-SSR bolj variabilni pri potencialnih opraševalnih oljčnih sortah oz. v starševski populaciji. Na posameznem lokusu se je pomnožilo od štiri (OeUP-05 in OeUP-21) do osem (OeUP-22) različnih alelov, v povprečju 5,7 alelov na lokus. Najvišja dejanska heterozigotnost ( $H_o=1,000$ ) je bila odkrita na lokusu OeUP-22, najnižja ( $H_o=0,542$ ) pa je bila značilna za lokus OeUP-42. V starševski populaciji smo izračunali tudi parametra verjetnosti izključitve (EP) in verjetnosti enakosti genotipov (PI). Kumulativna vrednost verjetnosti izključitve je bila 0,998, kar pomeni, da je bil izbran set markerjev primeren za izključitev skoraj vseh tistih potencialnih staršev oz. donorjev peloda, ki niso imeli dovolj podobnosti z danim potomcem oz. embrijem. Pri večini lokusov EST-SSR so bile vrednosti za verjetnost enakosti genotipov zelo nizke, od 0,30 do 0,08, in kažejo na to, da je bila verjetnost določitve napačnega donorja peloda zelo majhna. Najvišja informacijska vrednost polimorfizma (PIC=0,833) je bila izračunana na lokusu OeUP-22 in najnižja (PIC=0,528) na lokusu OeUP-42. Vseh sedem lokusov EST-SSR se je uvrstilo med informativne (PIC>0,5), lokusi OeUP-09, OeUP-16, OeUP-22 in OeUP-37 pa so izpolnjevali tudi kriterij o primernosti lokusov za gensko kartiranje (PIC>0,7).

Rezultate genotipizacije embrijev smo nato primerjali z genotipi 24 potencialnih opraševalnih sort in s pomočjo treh različnih računalniških programov izdelali starševski test. Pri programu FAMOZ (Gerber in sod., 2003) smo najverjetnejše donorje peloda vseh analiziranih embrijev določili z izračunom vrednosti LOD. Nato smo za vsako lokacijo v posameznem letu odčitali mejno vrednost LOD, in sicer iz presečišča dveh simulacijskih krivulj (Slika 24). Prva simulacija je bila narejena na 10,000 naključno ustvarjenih potomcih, katerih očetje so bili naključno izbrani iz seta genotipov referenčnih sort. Druga simulacija je bila prav tako narejena na 10,000 potomcih, ki pa so bili ustvarjeni iz naključno združenih gamet, na podlagi frekvenc alelov starševske populacije. Za potencialnega starša oz. donorja peloda smo izbrali tiste genotipe oz. potencialne opraševalne oljčne sorte, ki so imele vrednosti LOD višje od odčitane mejne vrednosti LOD.

V Ospu je mejna vrednost LOD v letu 2012 znašala 2,7, leta 2013 pa 2,8. Povprečna vrednost LOD potencialnih donorjeva peloda pa je bila v letu 2012 3,1 in v letu 2013 3,5. Nekoliko nižje mejne vrednosti LOD smo zabeležili v Strunjanu, v letu 2012 je bila 2,2 in leta 2013 2,3. Posledično sta bili v Strunjanu v obeh letih nižji povprečni vrednosti LOD potencialnih opraševalnih sort, 3,0 (2013) in 3,2 (2013). V Ospu smo najverjetnejše opraševalne sorte določili za 29,7 % (2012) oz. za 50,8 % (2013) embrijev, le v letu 2012 8,1 % embrijem nismo določili nobenega potencialnega donorja peloda (embriji z neznanim donorjem peloda). Poleg tega je imelo leta 2012 62,2 % embrijev in leta 2013 49,2 % embrijev vrednost LOD nižjo od mejne vrednosti, ki smo jo določili s simulacijo in smo jih poimenovali kot embrije z nedoločenim donorjem peloda. V Strunjanu smo najverjetnejše opraševalne sorte določili za 64,7 % (2012) oz. za 65,2 % (2013) embrijev.

Brez potencialnega donorja peloda je bilo v letu 2012 5,9 % embrijev in 2,2 % leta 2013. Tudi v Strunjanu smo zabeležili embrije, ki so imeli vrednosti LOD nižje od mejne vrednosti, in sicer 29,4 % (2012) oz. 32,6 % (2013) (Preglednica 9).



**Slika 24:** Določitev mejne vrednosti LOD iz presečišča krivulj pri programu FAMOZ  
**Figure 24:** LOD threshold value determination from two distributions intersect using FAMOZ

S pomočjo programa CERVUS smo najverjetnejše oprševalne sorte vseh analiziranih embrijev prav tako določili z izračunom vrednosti LOD. Sledila je simulacija na 10,000 potomcih za določitev mejne vrednosti LOD pri 95 % stopnji zaupanja. Izračunani mejni vrednosti LOD sta bili v Ospu 3,7 (2012) oz. 3,1 (2013), povprečni vrednosti LOD za potencialne donorje peloda pa 6,9 (2012) oz. 5,4 (2013). Tudi pri programu CERVUS so bile v Strunjanu mejne vrednosti LOD nekoliko nižje, in sicer 3,0 (2012) oz. 2,9 (2013). Povprečni vrednosti LOD potencialnih donorjev peloda pa sta bili v Strunjanu 3,9 (2012) oz. 4,0 (2013). V Ospu smo najverjetnejše oprševalne sorte določili za 32,4 % (2012) oz. za 33,4 % (2013) embrijev, med tem ko 37,8 % embrijem (2012) oz. 14,3 % embrijem nismo določili nobenega potencialnega donorja peloda. V Ospu smo leta 2012 zabeležili 29,7 % embrijev, leta 2013 pa 52,4 % embrijev z nedoločenim donorjem peloda, ker so bile njihove vrednosti LOD pod mejno vrednostjo. V Strunjanu smo v letu 2012 potencialnega donorja peloda določili za 41,2 % embrijev in leta 2013 za 52,2 % embrijev, brez potencialne oprševalne sorte pa je bilo 5,9 % (2012) oz. 10,9 % (2013) embrijev.

V Strunjanu je odstotek embrijev, ki so imeli vrednosti LOD nižje od mejne vrednosti, znašala 52,9 % (2012) oz. 37 % (2013) (Preglednica 9).

S programom PARENTE smo v Ospu določili najverjetnejše opravevalne sorte za 45,9 % embrijev (2012) oz. za 66,7 % embrijev (2013). V Ospu je bilo 54,1 % (2012) oz. 33,3 % (2013) embrijev brez donorja peloda. V Strunjanu smo potencialne donorje peloda pripisali 52,9 % embrijem (2012) oz. 58,7 % embrijem (2013). Brez potencialnega donorja peloda pa je bilo v Strunjanu 47,1 % (2012) oz. 41,3 % embrijev (Preglednica 9).

**Preglednica 9:** Rezultati starševskega testa s tremi različnimi programi: FAMOZ, CERVUS, PARENTE. Število vseh analiziranih embrijev, število in odstotek embrijev z neznanim donorjem peloda, embrijev z nedoločenim donorjem peloda in embrijev z enim določenim donorjem peloda v Ospu in Strunjanu, v letih 2012 in 2013

**Table 9:** Parentage analysis results using three computer programmes: FAMOZ, CERVUS, PARENTE. A total number of analyzed embryos, number and percentage of embryos with no likely pollen donor, embryos with unassigned pollen donor and embryos assigned with one select polleniser in Osp and Strunjan, in 2012 and 2013

Merjeni parametri		Računalniški program		
		FAMOZ	CERVUS	PARENTE
Osp 2012	Št. analiziranih embrijev	37	37	37
	Neznan donor peloda	3 (8,1 %)	14 (37,8 %)	20 (54,1 %)
	Donor peloda nedoločen	23 (62,2 %)	11 (29,7 %)	/
	Donor peloda določen	11 (29,7 %)	12 (32,4 %)	17 (45,9 %)
Osp 2013	Št. analiziranih embrijev	63	63	63
	Neznan donor peloda	0 (0,0 %)	9 (14,3 %)	21 (33,3 %)
	Donor peloda nedoločen	31 (49,2 %)	33 (52,4 %)	/
	Donor peloda določen	32 (50,8 %)	21 (33,3 %)	42 (66,7 %)
Strunjan 2012	Št. analiziranih embrijev	17	17	17
	Neznan donor peloda	1 (5,9 %)	1 (5,9 %)	8 (47,1 %)
	Donor peloda nedoločen	5 (29,4 %)	9 (52,9 %)	/
	Donor peloda določen	11 (64,7 %)	7 (41,2 %)	9 (52,9 %)
Strunjan 2013	Št. analiziranih embrijev	46	46	46
	Neznan donor peloda	1 (2,2 %)	5 (10,9 %)	19 (41,3 %)
	Donor peloda nedoločen	15 (32,6 %)	17 (37,0 %)	/
	Donor peloda določen	30 (65,2 %)	24 (52,2 %)	27 (58,7 %)

V Ospu se je leta 2012 kot najpogostejši donor peloda s programom FAMOZ izkazala sorta 'Leccino' (36,4 %), z drugima dvema programoma pa sorta 'Črnica' (33,3 % oz.

47,1 %). Na drugo mesto se je pri vseh treh programih uvrstila sorta 'Frantoio', s 27,3 % (FAMOZ), 16,7 % (CERVUS) oz. 17,6 % (PARENTE). Pri porgramih FAMOZ (18,2 %) in CERVUS (16,7 %) je sledila sorta 'Moraiolo', pri programu PARENTE pa sorta 'Leccino' (11,8 %). Za 9,1 % embrijev se je kot najpogostejsa opraševalna sorta izkazala sorta 'Ascolana tenera' (FAMOZ), za 16,7 % embrijev sorta 'Samo' (CERVUS) in za 11,8 % embrijev sorta 'Athena' (PARENTE) (Preglednica 10).

**Preglednica 10:** Potencialni donorji peloda ter odstotki embrijev (%) v Ospu in Strunjanu, v letih 2012 in 2013, določeni s tremi različnimi računalniškimi programi (FAMOZ, CERVUS, PARENTE)

**Table 10:** Potencial pollen donors and percentage of embryos (%) in Osp and Strunjan, in 2012 and 2013, using three different computer programs (FAMOZ, CERVUS, PARENTE)

Merjeni parametri		Računalniški program		
		FAMOZ	CERVUS	PARENTE
Donorji peloda in odstotek embrijev (%)	Osp 2012	'Leccino' (36,4 %)	'Črnica' (33,3 %)	'Črnica' (47,1 %)
		'Frantoio' (27,3 %)	'Frantoio' (16,7 %)	'Frantoio' (17,6 %)
		'Moraiolo' (18,2 %)	'Moraiolo' (16,7 %)	'Leccino' (11,8 %)
		'Ascolana tenera' (9,1 %)	'Samo' (16,7 %)	'Athena' (11,8 %)
Donorji peloda in odstotek embrijev (%)	Osp 2013	'Frantoio' (40,6 %)	'Frantoio' (38,1 %)	'Frantoio' (31,0 %)
		'Leccino' (18,8 %)	'Črnica' (19,0 %)	'Leccino' (19,0 %)
		'Črnica' (9,4 %)	'Moraiolo' (9,5 %)	'Črnica' (16,7 %)
		'Athena' (6,3 %)	'Maurino' (9,5 %)	'Buga' (9,5 %)
Donorji peloda in odstotek embrijev (%)	Strunjan 2012	'Leccino' (27,3 %)	'Leccino' (28,6 %)	'Leccino' (44,4 %)
		'Picholine' (18,2 %)	'Picholine' (28,6 %)	'Picholine' (22,2 %)
		'Moraiolo' (9,1 %)	'Moraiolo' (14,3 %)	'Samo' (22,2 %)
		'Buga' (9,1 %)	'Samo' (14,3 %)	'Buga' (11,1 %)
Donorji peloda in odstotek embrijev (%)	Strunjan 2013	'Leccino' (20,0 %)	'Picholine' (29,2 %)	'Picholine' (29,6 %)
		'Picholine' (16,7 %)	'Leccino' (25,0 %)	'Leccino' (25,9 %)
		'Buga' (13,3 %)	'Buga' (16,7 %)	'Buga' (7,4 %)
		'Pendolino' (13,3 %)	'Santa Caterina' (8,3 %)	'Samo' (7,4 %)

Leta 2013 smo v Ospu z vsemi programi kot najpogostejo opraševalno sorto določili sorto 'Frantoio', in sicer za 40,6 % embrijev, 38,1 % embrijev oz. 31,0 % embrijev. Za 18,8 % embrijev (FAMOZ) oz. 19,0 % embrijev (PARENTE) se je kot potencialni donor peloda izkazala sorta 'Leccino', s programom PARENTE (19,0 % embrijev) pa sorta 'Črnica'. Sorta 'Črnica' se je s programom FAMOZ pokazala kot potencialni donor peloda za 9,4 % embrijev in s programom PARENTE za 16,7 % embrijev. S programom CERVUS pa se je

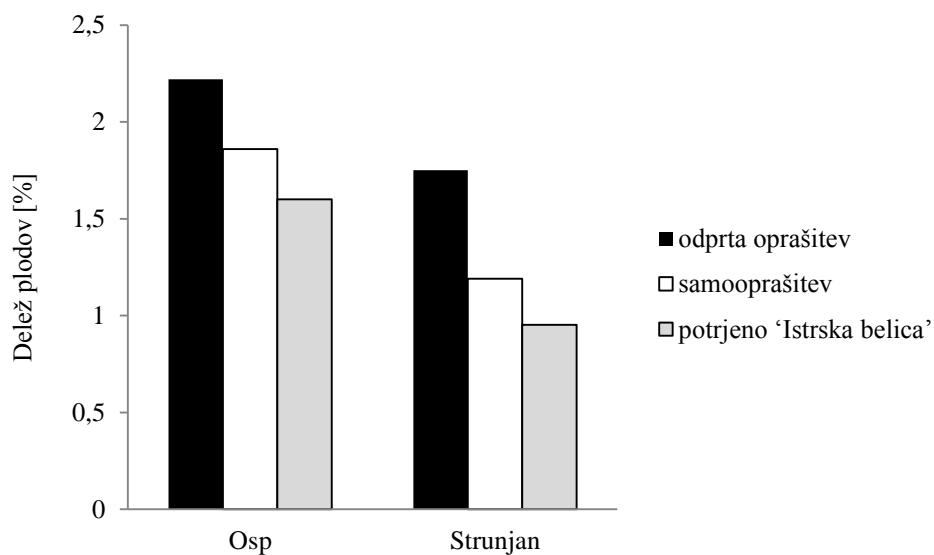
kot tretja najpogostejša opraševalna sorta pokazala sorta 'Moraiolo', značilna za 9,5 % embrijev (Preglednica 10).

V Strunjanu se je leta 2012 kot najpogostejša opraševalna sorta pokazala sorta 'Leccino', in sicer z vsemi uporabljenimi programi: 27,3 % embrijev s programom FAMOZ, 28,6 % embrijev s programom CERVUS, 44,4 % embrijev s programom PARENTE. Na drugo mesto se je enotno uvrstila sorta 'Picholine', značilna za 18,2 % embrijev (FAMOZ), 28,6 % embrijev (CERVUS) in 22,2 % embrijev (PARENTE). Na podlagi rezultatov programa FAMOZ in CERVUS je sorti 'Picholine' sledila sorta 'Moraiolo', značilna za 9,1 % oz. 14,3 % embrijev. Medtem ko se je s programom PARENTE na tretje mesto uvrstila sorta 'Samo', in sicer za 22,2 % embrijev.

Leta 2013 se je v Strunjanu s programoma CERVUS in PARENTE kot najpogostejša opraševalna sorta izkazala sorta 'Picholine' (29,2 % oz. 29,6 % embrijev) in sledila ji je sorta 'Leccino' (25,0 % oz. 25,9 % embrijev). Pri programu FAMOZ je bilo ravno obratno, za 20,0 % embrijev je bila najpogostejša opraševalna sorta 'Leccino', za 16,7 % pa sorta 'Picholine'. Pri vseh programih je bila na tretjem mestu sorta 'Buga', značilna za 13,3 % embrijev (FAMOZ), 16,7 % embrijev (CERVUS) oz. 7,4 % embrijev (PARENTE) (Preglednica 10).

Med vsemi analiziranimi embriji 'Istrske belice' smo odkrili samo štiri primere samooplodnosti, in sicer vse štiri samo z računalniškim programom FAMOZ. V Ospu smo odkrili en primer leta 2012 in v Strunjanu enega leta 2012 ter dva leta 2013. To nakazuje, da se sorte preferenčno oplodi s pelodom drugih sort. Pri vseh sortah, ki so se izkazale kot najpogostejše opraševalne sorte sorte 'Istrske belice', se obdobja trajanja polnega cvetenja prekrivajo s trajanjem polnega cvetenja 'Istrske belice'. Izjema sta bili le sorte 'Moraiolo' leta 2012, kjer se je obdobje trajanja polnega cvetenja 'Istrske belice' prekrivalo z začetkom cvetenja sorte 'Moraiolo', in sorta 'Maurino' leta 2013, kjer se je obdobje trajanja polnega cvetenja 'Istrske belice' začelo en dan kasneje (Preglednica 11).

Leta 2013 smo v Ospu in Strunjanu izvedli tudi poskus izolacije cvetov z opraševalnimi vrečkami in nato preverili dejanski delež samooplojenih embrijev ter samooploditev potrdili s sedmimi markerji EST-SSR. Slika 22 kaže vidne razlike v deležu plodov med lokacijama; delež plodov je v vseh primerih v Ospu nekoliko višji. Pri odkritih poganjkih je bila v Ospu oploditev uspešna pri 2,22 %, pri pokritih poganjkih pa se je uspešno oplodilo 1,86 % plodov. Delež plodov v Strunjanu je pri odprtih opašitvi znašal 1,75 %, pri samoopašitvi pa 1,19 % (Slika 25). Iz števila plodov, ki so se razvili znotraj opaševalnih vrečk in na odkritih poganjkih, smo izračunali še indeks samonekompatibilnosti (SI). V kolekcijskem nasadu v Strunjanu je znašal indeks SI 0,6 in v enosortnem nasadu v Ospu 0,9, kar pomeni, da se je 'Istrska belica' na obeh lokacijah izkazala kot delno samonekompatibilna.



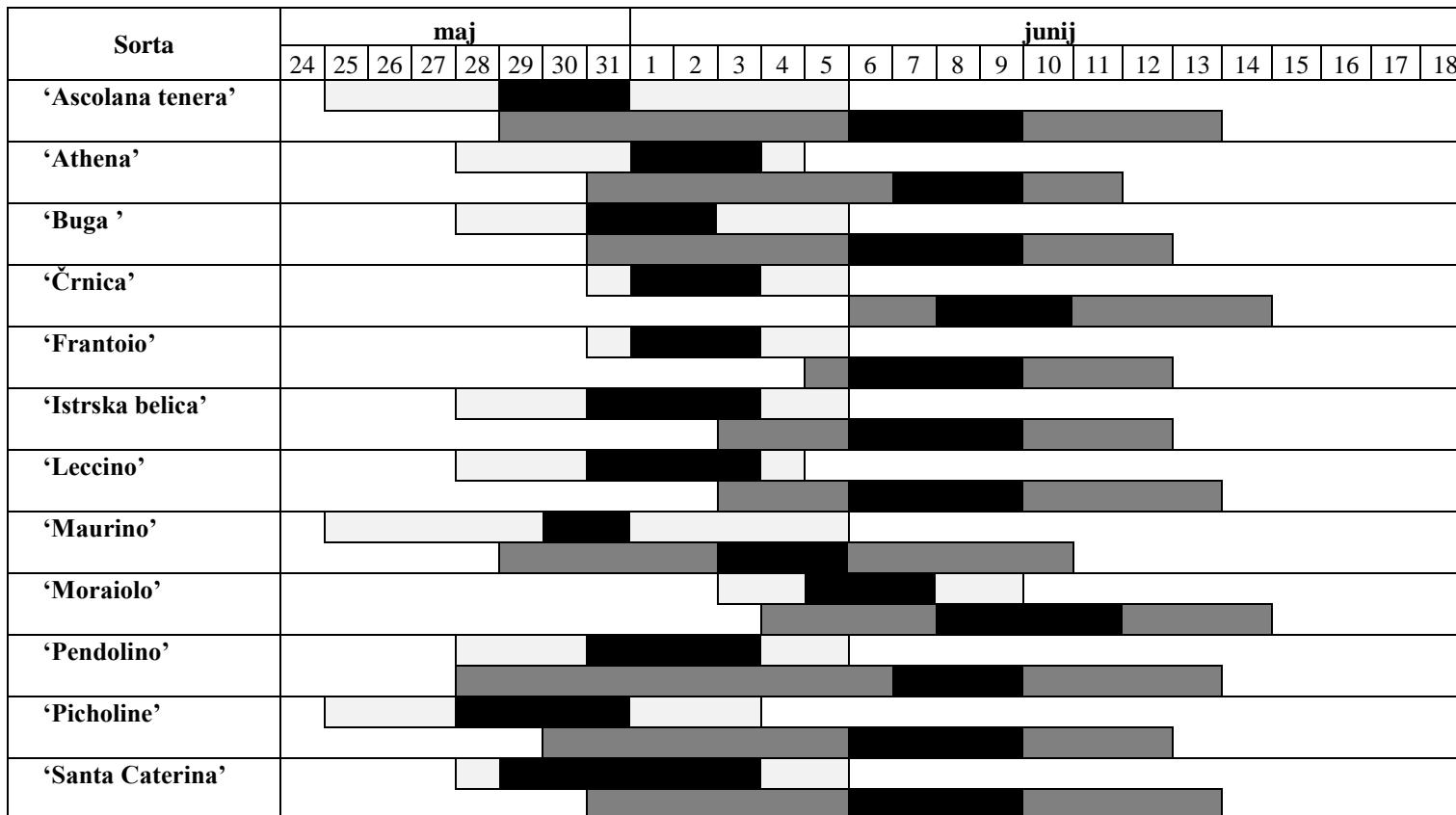
**Slika 25:** Delež plodov pri odkritih (naravna oprašitev) in pokritih (samooprašitev) poganjkih ter delež potrjenih samooplojenih plodov 'Itrske belice'

**Figure 25:** Percentage of open-pollinated and self-pollinated olive fruits, and percentage of self-pollinated and confirmed olive fruits of variety 'Itrska belica'

Tako v Ospu kot v Strunjanu smo pri potrjevanju samooploditve z markerji EST-SSR ugotovili, da se vsi plodovi v opaševalnih vrečkah niso oplodili s pelodom 'Itrske belice'. Izmed vseh plodov, ki so se razvili v opaševalnih vrečkah, smo v Ospu samooploditev potrdili pri 86,4 % plodov, v Strunjanu pa je bilo samooplojenih 80 % plodov.

**Preglednica 11:** Obdobje cvetenja devetih oljčnih sort na lokaciji Strunjan v letih 2012 (svetlo siva barva) in 2013 (temno siva barva). Obdobje polnega cvetenja je označeno s črno barvo

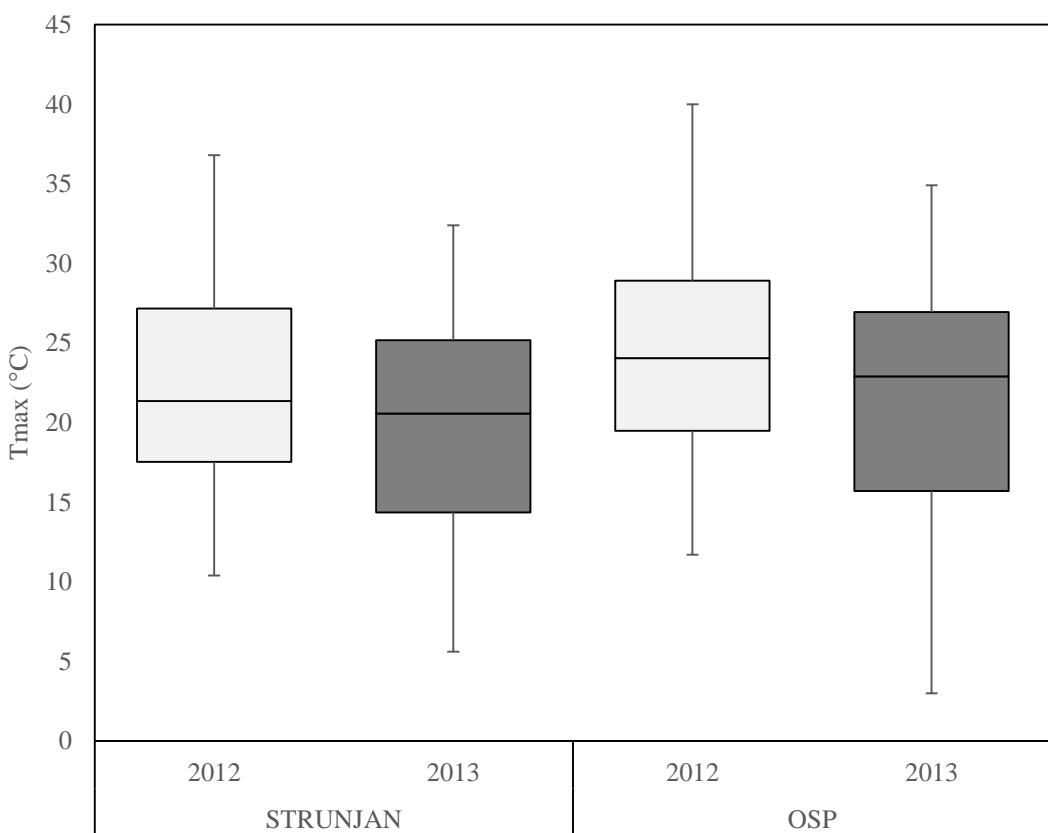
**Table 11:** Flowering period for nine olive varieties in Strunjan in 2012 (light grey) and in 2013 (dark grey). Black colour indicates full flowering period



#### 4.6 ANALIZA VREMENSKIH RAZMER V LETIH 2012 IN 2013

Za lokacijo Osp in Strunjan smo iz bližnjih meteoroloških postaj zbrali dnevne podatke o maksimalni temperaturi zraka  $T_{max}$  ( $^{\circ}C$ ) in količini padavin (mm). Za leti 2012 in 2013 smo v analizo vključili podatke za obdobje od meseca marca do konca meseca julija, saj pri oljki na začetek in dolžino cvetenja vpliva že temperatura zraka pred približno dvema mesecema (Rallo in Cuevas, 2010). Ob koncu meseca julija pa se zaključi trebljenje plodov (Sancin, 1990; Rapoport, 2010).

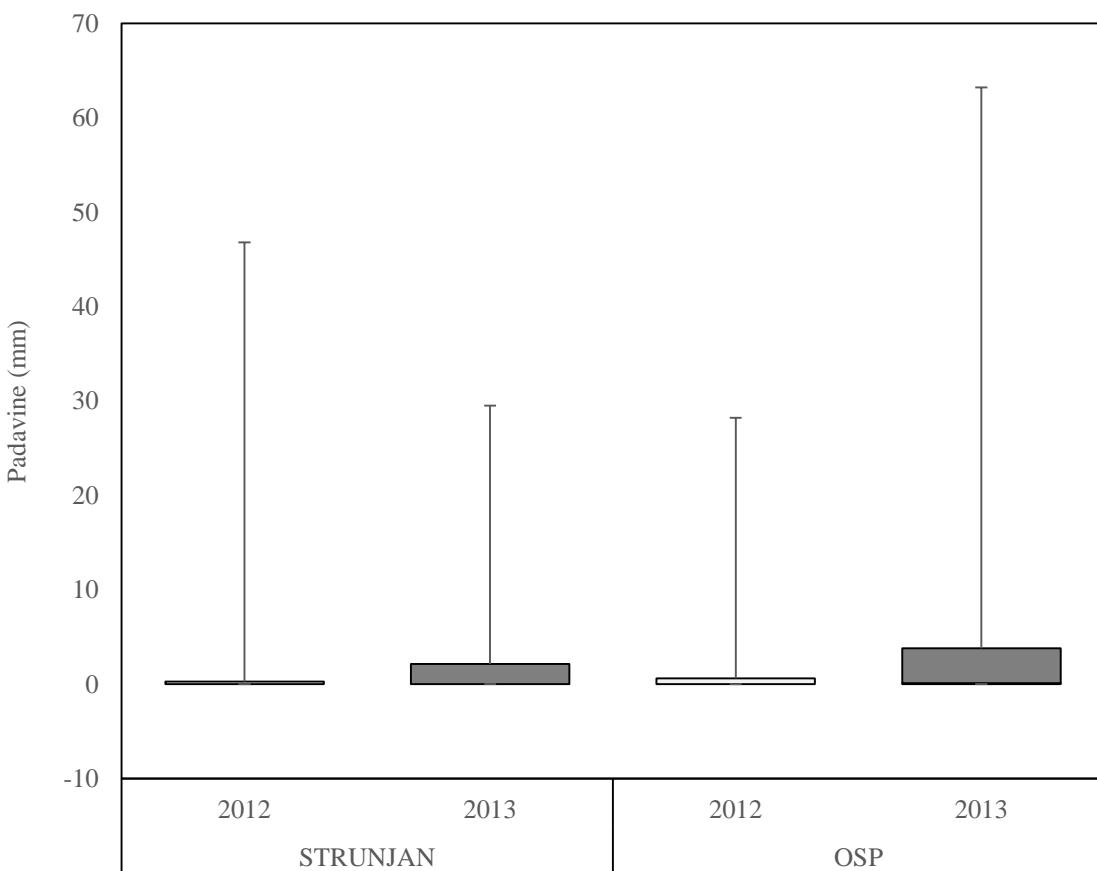
Povprečna vrednost  $T_{max}$  je leta 2012 v Ospu znašala  $24,4^{\circ}C$  in leta 2013  $21,8^{\circ}C$ . Tudi v Strunjalu je bila povprečna vrednost  $T_{max}$  višja leta 2012 ( $22,3^{\circ}C$ ) v primerjavi z letom 2013 ( $20,6^{\circ}C$ ). Primerjava spremenljivke  $T_{max}$  v Ospu ( $p=0,000$ ) in Strunjalu ( $p=0,028$ ) je za posamezno lokacijo pokazala statistično značilne razlike med letoma 2012 in 2013. Vrednosti maksimalnih dnevnih temperatur so se v letu 2012 ( $p=0,000$ ) in 2013 ( $p=0,000$ ) statistično značilno razlikovale med lokacijama Osp in Strunjan (Slika 26).



**Slika 26:** Vrednosti maksimalnih dnevnih temperatur ( $^{\circ}C$ ) v obdobju od meseca marca do konca meseca julija, glede na proučevano lokacijo v letih 2012 in 2013

**Figure 26:** Daily maximum temperatures ( $^{\circ}C$ ), in the period from March to July, according to the studied location in 2012 and 2013

Statistična analiza podatkov o količini padavin je pokazala, da je v Ospu leta 2012 padlo povprečno 2,1 mm dežja in leta 2013 povprečno 4,2 mm. Prav tako so bile v Strunjanu padavine nekoliko obilnejše leta 2013 (povprečno 3,0 mm) v primerjavi z letom 2012 (povprečno 1,8 mm). Primerjava podatkov o količini padavin v Ospu ( $p=0,000$ ) in Strunjanu ( $p=0,010$ ) je za posamezno lokacijo pokazala statistično značilne razlike med letoma 2012 in 2013. Kar zadeva primerjavo količine padavin med obema lokacijama v posameznem letu, smo v letu 2012 ( $p=0,000$ ) ugotovili statistično značilne razlike med lokacijo Osp in Strunjan. Leta 2013 ( $p=0,087$ ) se količina padavin med lokacijama ni statistično značilno razlikovala (Slika 27).



**Slika 27:** Vrednosti dnevnih količin padavin (mm) v obdobju od meseca marca do konca meseca julija, glede na proučevano lokacijo v letih 2012 in 2013

**Figure 27:** Daily precipitacion values (mm), in the period from March to July, according to the studied location in 2012 and 2013

Po podatkih ARSO je leto 2012 zaznamovala kmetijska suša (ARSO, 2012). Nanjo je vplival že jesenski primanjkljaj padavin, ki je na Primorskem tudi v letu 2012 samo še naraščal. Od oktobra 2011 do konca poletja 2012 ni bilo na Primorskem obilnejših padavin. Od začetka aprila do konca avgusta 2012 je bilo kar 67 % dni suhih in le v sedmih

dni je padlo več kot 10 mm dežja. Poleg tega sta nenavadno močna otoplitev ob koncu februarja 2012 in topel marec 2012 vplivala tudi na hitrejši spomladanski fenološki razvoj rastlin (Sušnik in Valher, 2012).

Sušnemu letu 2012 je sledilo deževno leto 2013, ko je padlo za približno 15 % več padavin kot v letu 2012. Obilne padavine leta 2013 so najbolj zaznamovale marec in maj. Zima je bila nekoliko hladnejša kot leta 2012, vendar ni bila izrazito hladna. Po podatkih meteorološke postaje na letališču Portorož je bil zelo mrzel mesec marec, ko je bila povprečna mesečna temperatura kar 5 °C nižja kot leto pred tem.

## 5 RAZPRAVA

Pridelava oljk (*Olea europaea* L.) je osrednja kmetijska panoga na območju sredozemskega bazena, saj jo odlikuje visoka gospodarska vrednost. Kljub svetovnemu trendu k zmanjšanju uživanja olj in maščob, se pridelava in uživanje oljčnega olja povečujeta po vsem svetu (Uylaşer in Yıldız, 2014). Oljčno olje je funkcionalno živilo, ker vsebuje biološko aktivne molekule (biofenoli, skvalen, tokoferoli in fitosteroli), ki prispevajo k njegovim terapevtskim učinkom (Stark in Madar 2002; Ghanbari in sod. 2012; Ali Hashmi in sod. 2015) in k edinstvenemu okusu oljčnega olja (Cicerale in sod. 2009). Oljčni plodovi so neke vrste bio-tovarna za proizvodnjo biološko aktivnih molekul, zato je izjemno pomembno poznavanje genov, ki so odgovorni za sintezo teh molekul, in procesov, v katerih sodelujejo. Z razvojem in izboljšanjem tehnologije sekvenciranja DNA se je skokovito povečal dostop do obsežnih zbirk izraženih nukleotidnih zaporedij (EST). Zbirke EST predstavljajo neposredno informacijo o izražanju genov v določenem razvojnem stadiju, bodisi v celicah, tkivih ali organih proučevanega organizma, in so zato zelo koristno orodje za razvoj genskih markerjev EST-SSR. Visoko kakovostni in učinkoviti markerji EST-SSR so potrebni za spremljanje dedovanja v žlahtniteljskih programih oljke in poznavanje biokemijskih poti sinteze biološko aktivnih molekul ter za izdelavo genskih kart visoke gostote. Markerji EST-SSR so primerni tudi za proučevanje opršeavalnih odnosov in navzkrižne kompatibilnosti sort, ki so ključnega pomena za dobro rodnost oljčnih nasadov. V doktorskem delu smo predstavili razvoj novega seta markerjev EST-SSR oljke in primerjavo markerjev EST-SSR z genomske mikrosateliti oljke. Primerjali smo parametre variabilnosti genskih in genomskeh markerjev ter uporabnost obeh markerskih sistemov pri proučevanju sorodnosti oljčnih sort in pri upravljanju kolekcij oljk. Z novimi markerji EST-SSR smo izdelali starševski test in določili najpogosteje opršeavalne sorte 'Istrske belice'.

### 5.1 RAZVOJ IN KARAKTERIZACIJA MARKERJEV EST-SSR

Izboljšanje genskih virov kmetijskih rastlin s pomočjo sodobnih žlahtniteljskih programov temelji na molekularni biotehnologiji, ki vključuje molekulske markerje v kombinaciji z izdelavo vezanih genskih kart in genomske študije (Jiang, 2013). Genski markerji so določeni z alelnimi oblikami genov oz. genskimi lokusi, ki se dedujejo oziroma prenašajo s staršev na potomce ter tako predstavljajo najmočnejše orodje, s pomočjo katerega se lahko v žlahtniteljskih programih sledi genom oz. želenim lastnostim. V zadnjem času so bile za številne kmetijske rastline izdelane obsežne podatkovne baze EST, ki so omogočile identifikacijo in razvoj mnogih funkcijskih molekulskeh markerjev, povezanih z geni oz. s proučevanimi lastnostmi. Čeprav naj bi bila oljka na območju Sredozemlja ena najpomembnejših rastlin za pridobivanje olja, je trenutno zanjo na voljo le nekaj markerjev EST-SSR, ki so bili tudi ustrezno testirani (De la Rosa in sod., 2013; Adawy in sod., 2013;

Essalouh in sod., 2014; Mariotti in sod., 2016). Le De la Rosa in sod. (2013) ter Mariotti in sod. (2016) so razvite markerje EST-SSR tudi ovrednotili in objavili skupno 35 parov začetnih oligonukleotidov. To dejstvo je bilo glavni povod za razvoj novih, visoko kakovostnih in informativnih markerjev EST-SSR, ki bodo na voljo tudi drugim raziskovalnim skupinam in bodo lahko prispevali k raziskavam na področju funkcijске genomike in dedovanja agronomsko pomembnih lastnosti pri oljki. Razpoložljivost visoko informativnih markerjev je namreč osnova za napredek v žlahtniteljskih programih, ki lahko hitreje privedejo do izboljšanja genskega materiala rastlin.

Za razvoj novih markerjev EST-SSR smo uporabili transkriptom razvijajočega plodu oljke sorte 'Itrska belica', ki ga je slovenska raziskovalna skupina razvila s pomočjo metodologije pirosekvenciranja 454 (SRX215662, 2012; Rešetič in sod., 2013). Transkripti so bili razviti iz sorte 'Itrska belica', ki ima zaradi visoke vsebnosti biofenolov posebne organoleptične lastnosti, poleg tega pa jo odlikujejo dobra rodnost in oljevitost. Za identifikacijo mikrosatelitov smo pregledali 98.924 zaporedij EST oljke. Mikrosatelite smo odkrili v 923 zaporedjih EST, skupno 984 mikrosatelitov. V analiziranih zaporedjih EST oljke se je tako na 37,4 kb nahajal povprečno en lokus EST-SSR. V naši raziskavi je približno 1 % zaporedij EST oljke vseboval mikrosatelite. Mariotti in sod. (2016) so mikrosatelite odkrili v približno 7 % zaporedij EST ploda oljke in na 3,5 kb se je nahajal povprečno en mikrosatelitski lokus. Adawy in sod. (2013) so mikrosatelite odkrili v kar 36,5 % zaporedij EST oljke, ki so jih pridobili iz podatkovne baze NCBI in so bila izolirana v različnih okoljskih razmerah ter v različnih razvojnih stadijih oljke. Skladno z višjim odstotkom zaporedij EST-SSR se je en mikrosatelitski lokus nahajal na približno 0,8 kb (Adawy in sod., 2013). Različni avtorji poročajo o visokih frekvencah tudi pri drugih sredozemskih vrstah: pri vinski trti 2,98 % (Huang in sod., 2011), pri citrusih 20,1 % (Liu in sod., 2013), pri breskvi 18 % (Vendramin in sod., 2007) in pri granatnem jabolku 11 % (Jian in sod., 2012). Raziskave kažejo, da so pri enokaličnicah mikrosateli prisotni v 1,5 % do 4,7 % zaporedjih EST (Kantety in sod., 2002) in pri dvokaličnicah v območju med 2,7 % in 16,8 % (Kumpatla in Mukhopadhyay, 2005). Na podlagi primerjave številnosti in razporeditve mikrosatelitov v zaporedjih EST pri različnih rastlinskih vrstah je težko podati tehtne zaključke, saj na končni rezultat vplivajo različni dejavniki (Varshney in sod., 2005b). Razlike v pogostosti pojavljanja in v razporeditvi zaporedij EST-SSR lahko pripišemo različnim kriterijem, ki so bili uporabljeni za identifikacijo mikrosatelitov v podatkovni zbirki, npr. dolžina mikrosatelita in število ponovitev osnovnega mikrosatelitskega motiva (Dutta in sod., 2011;). Na končni rezultat lahko vpliva tudi velikost nabora podatkov in izbira orodja za pregledovanje podatkovne zbirke (Varshney in sod., 2005b; Gupta in sod., 2014). Poleg tega so variacije v pogostosti pojavljanja in porazdelitvi markerjev SSR vrstno specifične (Li in sod., 2004; Lawson in Zhang, 2006) in lahko odražajo razlike, do katerih je prišlo zaradi procesov selekcije in domestikacije (Zhang in sod., 2013). V naši analizi je vzrok za nizek odstotek odkritih mikrosatelitov v zaporedjih EST lahko posledica strožjih kriterijev pri identifikaciji

mikrosatelitov. Za razliko od Mariotti in sod. (2016) ter Adawy in sod. (2013) nismo v iskanje vključili mononukleotidnih mikrosatelitov. V obeh študijah je bil odstotek mononukleotidnih mikrosatelitov izjemno visok, 79,6 % (Mariotti in sod., 2016) oz. 77,6 % (Adawy in sod., 2013). Poleg tega smo za di-, tri- in tetra-nukleotide določili večje število ponovitev osnovnega mikrosatelitskega motiva, kot v predhodnih dveh študijah.

Naši rezultati kažejo, da je bilo med vsemi identificiranimi mikrosateliti največ dinukleotidnih motivov (35,6 %) in z nekoliko nižjim odstotkom (32,5 %) so jim sledili trinukleotidni motivi, kar je v skladu z rezultati, objavljenimi pri oljki (Essalouh in sod., 2014), sezamu (Wei in sod., 2008; Zhang in sod., 2012) in nekaterih vrstah iz družine rožnic (Rosaceae) (Jung in sod., 2005). Analiza 11.215 zaporedij EST oljke, pridobljenih iz baze NCBI, pa je pokazala, da so med najbolj pogosto zastopanimi tri- in za njimi di-nukleotidni motivi (Adawy in sod., 2013). Tudi pri mnogih drugih sredozemskih vrstah, citrusih (Liu in sod., 2013), granatnem jabolku (Jian in sod., 2012), vinski tri (Huang in sod., 2011), in pri žitaricah (Kantety in sod., 2002), so bile najpogosteje zastopane trinukleotidne mikrosatelitske ponovitve. V transkriptomu razvijajočega plodu 'Istrske belice' je bil med dinukleotidnimi markerji SSR najbolj pogost motiv GA/TC (36,9 %), ki mu je sledil motiv AG/CT (30,0 %). Mikrosatelitski motiv GA/TC se je izkazal kot najpogostejši tudi pri analizi zaporedij EST oljke iz podatkovne baze NCBI (Adawy in sod., 2013) ter v zaporedjih EST pri metuljnicih (Choudhary in sod., 2009; Gupta in Gopalakrishna, 2010; Dutta in sod., 2011; Gupta in sod., 2014) in žitih (Varshney in sod., 2002; Parida in sod., 2006). Essalouh in sod. (2014) pa so v transkriptomu oljke odkrili, da je med dinukleotidi najbolj zastopan motiv AG/CT. V naši raziskavi je med trinukleotidi prevladoval motiv GAA/TTC (15,6 %), kar je v skladu s predhodnimi raziskavami pri oljki. Essalouh in sod. (2014) ter Adawy in sod. (2013) so pri analizi trinukleotidnih mikrosatelitskih motivov v transkriptomu oljke odkrili, da je najbolj zastopan motiv GAA/TTC. Podobni rezultati so bili pridobljeni pri proučevanju vinske trte (Huang in sod., 2011), citrusov (Chen in sod., 2006), manga (Dillon in sod., 2014), metuljnici (Gupta in sod., 2014) in pri žitih (Varshney in sod. 2002), kjer je v vseh primerih med trinukleotidi prevladoval mikrosatelitski motiv GAA/TTC. Znano je, da pri različnih rastlinskih vrstah med zaporedji EST-SSR prevladujejo di- in tri-nukleotidi, med tem ko se najpogostejši mikrosatelitski motivi lahko razlikujejo med vrstami (Varshney in sod., 2005b).

Po končani anotaciji v ne-redundantni proteinski bazi NCBI in dodelitvi domnevnih funkcij zaporedjem EST-SSR oljke, smo za izdelavo začetnih oligonukleotidov izbrali 110 regij EST, ki so vsebovale mikrosatelite. Pare začetnih oligonukleotidov smo uspešno izdelali za vsa izbrana zaporedja. V verižni reakciji s polimerazo (PCR) smo za vsak par začetnih oligonukleotidov določili optimalno temperaturo prileganja, da bi dosegli čim boljše pomnoževanje. Po končani optimizaciji protokola pomnoževanja (PCR) na skupini osmih oljčnih sort smo v primeru 46 (41,8 %) razvitih začetnih oligonukleotidov uspeli pridobiti kakovostne amplikone. Stopnja uspešnosti pomnoževanja je primerljiva z

markerji EST-SSR oljke (44,1 %), razvitimi iz zaporedij v podatkovni bazi NCBI (Adawy in sod., 2013). O nekoliko nižji uspešnosti (38,1 %) pomnoževanja markerjev EST-SSR poročajo Essalouh in sod. (2014). Glede dolžine pomnoženih mikrosatelitov nismo zaznali nobenih odstopanj, vse dolžine so bile v pričakovanem območju.

## 5.2 POTRDITEV NOVIH MARKERJEV EST-SSR S SEKVENČNO REAKCIJO

Vseh 46 novih markerjev EST-SSR smo potrdili tudi s sekvenčno reakcijo. Za vsak lokus EST-SSR smo izbrali tiste sorte oljk, ki so bile homozigotne in nato naredili eno sekvenčno reakcijo v smeri vodilnega, drugo pa v smeri povratnega začetnega oligonukleotida. Dobljena zaporedja vsakega posameznega lokusa smo poravnali in kot referenco dodali originalno zaporedje EST sorte 'Itrska belica'. Na podlagi zaporedij EST 'Itrske belice' smo namreč razvili pare začetnih oligonukleotidov. S sekvenčno reakcijo smo pri vseh 46 markerjih EST-SSR potrdili, da je šlo za pomnoževanje predvidenega mikrosatelitskega motiva. Poleg potrditve pomnoževanja mikrosatelitov, je sekvenčna reakcija razkrila tudi prisotnost točkovnih mutacij v obrobnih regijah mikrosatelitov.

S pomočjo sekvenčne reakcije smo določili nukleotidno zaporedje 63 različnih alelov in pri več kot polovici sekvenciranih alelov (52 %) v obrobnih regijah mikrosatelitov nismo odkrili indel mutacij. Med njimi je bila dobra polovica (18) takih alelov, katerih obrobne regije mikrosatelitov so bile v celoti homologne z originalnim zaporedjem EST 'Itrske belice', pri ostalih (15) pa smo odkrili substitucije posameznih nukleotidov. Raznolikost dolžin teh alelov je bila posledica različnega števila ponovitev osnovnega mikrosatelitskega motiva, kar je v skladu z modelom postopnega mutiranja (SMM<sup>56</sup>) (Kimura in Ohta, 1978; Valdes in sod., 1993). To je osnovni mutacijski model, ki opisuje evolucijo mikrosatelitov in predpostavlja, da je mutacija mikrosatelitov posledica dodajanja ali odvzemanja ene popolne ponovitve mikrosatelitskega motiva oz. pri posplošenem modelu večih ponovitev (Zhivotovsky in Feldman, 1995). Do daljšanja ali krašjanja mikrosatelitov pride velikokrat zaradi zdrsa DNA polimeraze in posledično nepravilnega parjenja med replikacijo (Schlötterer in Harr, 2001). Tudi v različnih drugih študijah se je izkazalo, da so mutacije mikrosatelitskih markerjev v skladu z modelom SMM. Lia in sod. (2007) so proučevali kompleksnost mutacij mikrosatelitov koruze. Med 10 analiziranimi lokusi so odkrili dva lokusa, pri katerih je bila raznolikost sekvenciranih alelov v skladu z modelom SMM. Xiao in sod. (2015) so objavili 16 mikrosatelitskih markerjev. Sekvenčno reakcijo so naredili le za dva lokusa in pri obeh so bile razlike v dolžinah alelov posledica različnega števila osnovnega mikrosatelitskega motiva. Tudi analiza petih markerjev EST-SSR ananasa je pokazala, da so bile različne

---

<sup>56</sup> Ang. Stepwise Mutation Model

dolžine alelov pri dveh lokusih izključno posledica različnega števila ponovitev osnovnega mikrosatelitskega motiva (Feng in sod., 2013).

Mutacije mikrosatelitov pa so lahko precej bolj kompleksne zaradi mutacij v obrobnih regijah mikrosatelitov, kar smo odkrili tudi v naši raziskavi. Pri preostalih 30 sekvenciranih alelih (48 %) so bile v obrobnih regijah mikrosatelitov prisotne indel mutacije. Pri teh alelih so lahko na različne dolžine alelov vplivale bodisi samo indel mutacije ali pa kombinacija indel mutacij in različnega števila ponovitev mikrosatelitskega motiva. Različne raziskovalne skupine poročajo o polimorfizmu v obrobnih regijah mikrosatelitskih markerjev pri koruzi (Matsuoka in sod., 2002; Mogg in sod., 2002; Lia in sod., 2007), vinski trti (Fernández in sod., 2008) in ananasu (Feng in sod., 2013). V naši raziskavi so bile indel mutacije prisotne le v obrobnih regijah mikrosatelitov in pri nobenem sekvenciranem alelu niso povzročile prekinitev mikrosatelitske regije. Medtem ko pri koruzi in ananasu poročajo o prekinitvah mikrosatelitov zaradi indel mutacij, ki so vplivale na skrajšanje mikrosatelitev. Prekinitev ponavljajočega se mikrosatelitskega motiva lahko vpliva tudi na manjšo verjetnost zdrsa DNA polimeraze in posledično na manjšo variabilnost mikrosatelitskega lokusa (Estoup in sod., 2002).

Glede dolžine sekvenciranih alelov pri oljki nismo zaznali nobenih odstopanj. Vse dolžine so bile v pričakovanem območju, saj so bile identificirane indel mutacije razmeroma kratke. V večini primerov je šlo za insercijo ali delecijo od 1 do 5 nukleotidov. Insercije daljših odsekov obrobnih regij mikrosatelitov lahko vodijo do nastanka bistveno krajših alelov, t.i. osamljenih primerov. Matsuoka in sod. (2002) so analizirali prisotnost indel mutacij pri 46 lokusih koruze in pri dveh lokusih odkrili izstopajoče dolžine alelov. Ti aleli so bili povsem homologni z ostalimi sekvenciranimi aleli, vendar so se pri njih pojavile delecije od 39 do celo 81 nukleotidov. S pomočjo sekvenčne reakcije smo ugotovili, da lahko insercije oz. delecije krajših odsekov obrobnih regij mikrosatelitov vodijo do zavajajočih rezultatov. Tak primer smo odkrili na lokusu OeUP-02. Sorti 'Moraiolo' in 'Leccio del Corno' sta imeli na tem lokusu enako število ponovitev mikrosatelitskega motiva. Dolžini alelov, ki smo ju določili z genotipizacijo, pa sta se razlikovali, kar je bila posledica delecije devetih nukleotidov. Ta primer potrjuje, kako pomembno je poznavanje nukleotidnega zaporedja proučevanih mikrosatelitskih lokusov. V nasprotnem primeru obstaja nevarnost napačne interpretacije rezultatov genotipizacije z mikrosatelitskimi markerji.

Pri vseh 46 markerjih EST-SSR smo potrdili zelo visoko stopnjo ohranjenosti mest prileganja začetnih oligonukleotidov, kar je ključnega pomena za bodoče uspešno pomnoževanje novega seta genskih mikrosatelitov oljke.

### 5.3 ANALIZA MIKROSATELITSKIH SEKVENC TRANSKRIPTOMA OLJKE

Z namenom, da bi vsakemu zaporedju EST, v katerem smo identificirali mikrosatelitske markerje, pripisali znane proteinske produkte in biološke funkcije, smo iskanje podobnosti izvedli z orodjem Blast2GO v ne-redundantni proteinski bazi NCBI, s pomočjo algoritma BLASTX. Od skupno 923 analiziranih zaporedij EST smo znane proteinske produkte uspešno pripisali 26,8 % zaporedij EST-SSR, medtem ko je bilo 14,9 % zaporedij EST homolognih s hipotetičnimi/neznanimi/neimenovanimi proteini in 58,3 % zaporedij EST ni imelo po analizi BLASTX nobenega proteinskega zadetka. Razmeroma visok odstotek zaporedij EST-SSR brez podobnih zadetkov v proteinski bazi je lahko posledica dejstva, da je bil velik delež naših zaporedij EST-SSR (65,2 %) iz nekodirajočih regij (UTR) in proteinski deli niso prisotni. Prav tako je mogoče, da zaporedjem EST-SSR nismo uspeli pripisati proteinskega zadetka zato, ker niso pokrivala celotne dolžine transkripta. Verjetnost za to je nekoliko večja v primeru uporabe tehnologije 454 sekvenciranja, ki praviloma zagotavlja krajše odčitke zaporedij (Alagna in sod., 2009). Povišan odstotek zaporedij brez domnevne proteinske funkcije lahko pripisemo tudi specifičnim funkcijam genov, ki so razviti in značilni izključno za vrsto *O. europaea* in jih še ni v bazi, o čemer so poročali že Alagna in sod. (2009). Vzrok za zaporedja brez zadetkov v proteinski bazi so lahko tudi kontaminacije, do katerih pride v postopku pridobivanja zaporedij EST. Sem sodi kontaminacija z vektorji, ki se jih je uporabilo za kloniranje in lahko se zgodi, da se del vektorja sekvenciaira skupaj z zaporedjem EST (Chen in sod., 2007). Možna je tudi kontaminacija z drugimi organizmi, npr. virusi, in sicer pri samem laboratorijskem delu, ali če so ti prisotni v tkivih organizma, za katerega se razvija zaporedja EST. Zaporedja EST pa se lahko kontaminirajo tudi z genomsko DNA iz samega organizma (Sorek in Safer, 2003).

Mikrosatelitski markerji se lahko nahajajo v različnih regijah znotraj določenega gena in imajo posledično pomembno vlogo pri razvoju organizma ter pri njegovem prilagajanju na okoljske razmere in preživetju, kar vodi do nenehne evolucije (Li in sod., 2004; Trifonov, 2004). Razporeditev mikrosatelitov v kodirajočih (CDS) in v nekodirajočih regijah (UTR) ter v intronih ni naključna. Sprememba dolžine mikrosatelitskega markerja v protein kodirajoči regiji in pripadajočih regijah UTR lahko vpliva na to, ali se bo gen aktiviral ali inaktiviral, predvsem zaradi premika bralnega okvirja (Li in sod., 2004). Znano je, da od 3 do 7 % izraženih genov vsebuje mikrosatelitske motive, ki pa se večinoma nahajajo v nekodirajočih regijah (UTR) (Thiel in sod., 2003). To smo potrdili tudi z analizo mikrosatelitskih motivov v transkriptomu oljke, ki je pokazala, da je bilo kar 65,2 % naših zaporedij EST-SSR pozicioniranih v nekodirajočih regijah (UTR) in le 34,8 % zaporedij EST-SSR se je nahajalo v kodirajočih regijah (CDS). Naši rezultati so skladni tudi s predhodnimi študijami pri citrusih (Liu in sod., 2013), kjer se je 35,0 % mikrosatelitov nahajalo v kodirajočih regijah in 65 % v nekodirajočih regijah. Raziskave pri sivki so pokazale, da so bili mikrosateliti približno enakomerno porazdeljeni, saj se je v kodirajočih

regijah nahajalo 55,2 % mikrosatelitov in v nekodirajočih 45,8 % (Adal in sod., 2015). Pri rastlinah je vloga mikrosatelitskih motivov pri izražanju genov manj raziskana. A obstaja študija, ki dokazuje, da je pri koruzi motiv CCG, ki se nahaja v 5' UTR regiji gena za ribosomalni protein, vključen v regulacijo oploditve (Dresselhaus in sod., 1999). Pri rižu pa so odkrili, da je različno število ponovitev motiva CT v 5' UTR regiji waxy gena povezano z vsebnostjo amiloze (Bao in sod., 2002; Bao in sod., 2006). To nakazuje, da so se mikrosatelitski markerji z določenimi motivi ohranili tekom naravne selekcije zaradi njihovih selektivnih prednosti (Zhang in sod., 2004).

Analiza mikrosatelitskih motivov v regijah UTR pri oljki je pokazala, da so prevladovali trinukleotidi (34,8 %), sledili pa so dinukleotidi (23,9 %). V kodirajočih regijah (CDS) oljke pa so prevladovali trinukleotidi (32,6 %). Ti rezultati so v skladu s predhodnimi raziskavami, ki so pokazale, da je frekvenca ne-trinukleotidnih mikrosatelitov v kodirajočih regija zelo nizka, in sicer zaradi negativne selekcije zoper mutacijam, ki povzročajo premik bralnega okvirja v kodirajočih delih DNA (Metzgar in sod., 2002). Do podobnih spoznanj so prišli Hanai in sod. (2007), saj so pri navadnem fižolu odkrili, da se dinukleotidni markerji SSR pretežno nahajajo v 5' UTR in 3' UTR regijah, trinukleotidni mikrosateliti pa so značilni za kodirajoče dele zaporedij EST. Znano je namreč, da imajo nekodirajoče regije mRNA ključno vlogo pri regulaciji genov (Mignone in sod., 2002). Tudi Fujimori in sod. (2003) so pri proučevanju riža in modelne rastline *Arabidopsis* zaključili, da so mikrosateliti pogosto zastopani v 5' obrobnem območju rastlinskih genov in so morebiti pomembni dejavniki pri uravnavanju izražanja genov. Poleg tega naj bi mikrosatelitski markerji v 5' UTR regijah služili kot vezavno mesto za proteine in s tem uravnavali prevajanje genske informacije ter sestavo in delovanje proteinov. Po drugi strani pa lahko podaljševanje dolžine mikrostalitov v 3' UTR regijah povzroči t.i. transkripcijski zdrs in s tem nastanek podaljšane mRNA, kar lahko vodi v moteno izrezovanje (intronov) oz. lepljenje (eksonov) in v motnje drugih celičnih funkcij (Li in sod., 2004).

S pomočjo programa Blast2GO smo 247 zaporedjem EST (26,8 %), ki so vključevala marker SSR, uspešno pripisali znane proteinske produkte, na podlagi katerih smo zaporedjem pripisali GO kategorije. Določitev bioloških funkcij je razkrila, da je bilo največ zaporedij EST povezanih z metabolnimi in celičnimi procesi, kar so odkrili tudi pri funkcijski analizi zaporedij EST pri citrusih (Liu in sod., 2013) in pri dateljnovi palmi (Zhao in sod., 2013). Na ravni celičnih komponent je bilo največ zaporedij EST povezanih s kategorijo znotrajcelične strukture. Med molekularnimi funkcijami pa sta prevladovala proces vezave, in sicer ATP oz. ionov ter katalitska aktivnost. Tudi pri citrusih (Liu in sod., 2013) in dateljnovi palmi (Zhao in sod., 2013) sta prevladovali molekularni funkciji: proces vezave in katalitska aktivnost. Ti primerljivi rezultati kažejo na to, da so se geni, vključeni v metabolne poti in biosintezo, pri rastlinah dobro ohranili (Liu in sod., 2013). Vseh 46 na novo razvitih markerjev EST-SSR je bilo v glavnem v povezavi s procesi

biosinteze lipidov, z razvojem embrijev ter s celičnim odgovorom na stres in zato predstavljajo dragoceno orodje za nadaljnje raziskave genoma oljke.

## 5.4 PRIMERJAVA NOVIH MARKERJEV EST-SSR Z GENOMSKIMI MIKROSATELITI OLJKE

Genomski mikrosatelitski markerji so že vrsto let med pomembnejšimi markerskimi sistemi, predvsem zaradi visokega polimorfizma in priročne tehnologije, vendar se v zadnjem času vse bolj uveljavljajo markerji EST-SSR, ker izhajajo iz izraženih nukleotidnih zaporedij in so primerni tudi za uporabo med sorodno oddaljenimi organizmi (Varshney in sod., 2005b). Kljub številnim aplikacijam, ki jih omogočajo genski markerji, je razpoložljivost ovrednotenih in polimorfnih markerjev EST-SSR pri oljki omejena (De la Rosa in sod., 2013; Lavee in sod., 2014; Mariotti in sod., 2016). Zato je izjemno pomembno, da si nenehno prizadevamo za razvoj učinkovitih molekulskih markerjev, ki lahko pripomorejo k boljšemu razumevanju genetskega ozadja kompleksnih lastnosti in k hitrejšemu žlahtnjenju oljke (Liu in sod., 2013). V okviru doktorske naloge smo uspešno razvili 46 lokusno specifičnih markerjev EST-SSR in s tem razširili nabor genskih markerjev pri oljki. Nove markerje EST-SSR smo primerjali s predhodno objavljenimi genomskeimi markerji SSR oljke. Na podlagi parametrov variabilnosti smo ocenili in primerjali informativnost obeh markerskih sistemov in nato primerjali še njuno uporabnost pri proučevanju sorodnostnih odnosov ter pri upravljanju koleksijskih oljčnih nasadov.

### 5.4.1 Primerjava parametrov variabilnosti genskih in genomskeh mikrosatelitov oljke

Za primerjavo parametrov varibilnosti genskih in genomskeh mikrosatelitskih markerjev smo uporabili 46 novih markerjev EST-SSR in 15 predhodno objavljenih genskih mikrosatelitskih lokusov oljke. Pomnoževanje markerjev je potekalo na 24 referenčnih oljčnih sortah, in sicer na 107 vzorcih oljk, saj je v nacionalnih koleksijskih nasadih večina sort zastopana z večjim številom dreves. Vsi lokusi EST-SSR in genomske markerje SSR so se izkazali kot polimorfni. Pri analiziranih sortah oljk smo z markerji EST-SSR pomnožili skupno 205 alelov in z genomskeimi markerji SSR 102 alela, kar je v skladu s pričakovanji, saj smo uporabili približno trikrat več markerjev EST-SSR. Za lažjo primerjavo markerskih sistemov smo zato izračunali povprečno število alelov na lokus, ki je pri markerjih EST-SSR znašalo 4,5 alelov na mikrosatelitski lokus in pri genomskeh markerjih SSR 6,8 alelov na lokus. Zelo podobno povprečno število alelov na lokus (4,7) so pri 26 markerjih EST-SSR izračunali Mariotti in sod. (2016). Očitno je, da je bilo povprečno število alelov na lokus pri genomskeh mikrosatelitih višje kot pri genskih mikrosatelitih, kar kaže na večjo moč razlikovanja genomskeh markerjev SSR (Hu in sod., 2011). Vrednost, ki pove veliko o informativnosti lokusa, je efektivno število alelov na lokus ne

(Frankham in sod., 2002). Povprečna vrednost  $n_e$  je bila v primeru naših markerjev EST-SSR 3,13 in pri genomskeh mikrosatelitih 4,05. Mariotti in sod. (2016) so pri svojih markerjih EST-SSR ugotovili nekoliko nižjo povprečno vrednost  $n_e$  (2,81). Povprečni vrednosti dejanske ( $H_o$ ) in pričakovane ( $H_e$ ) heterozigotnosti sta pri markerjih EST-SSR znašali 0,649 oz. 0,604, pri genomskeh markerjih SSR pa 0,854 oz. 0,729. Mariotti in sod. (2016) so pri analizi 32 oljčnih sort s 26 markerji EST-SSR odkrili nižje vrednosti dejanske in pričakovane heterozigotnosti ( $H_o=0,534$ ,  $H_e=0,561$ ). Nekoliko višje vrednosti dejanske in pričakovane heterozigotnosti ( $H_o=0,752$ ,  $H_e=0,725$ ) so De la Rosa in sod. (2013) ugotovili pri testiranju osmih markerjev EST-SSR na 12 oljčnih sortah in hkrati potrdili, da je sposobnost genomskeh in genskih markerjev SSR za proučevanje genetske raznolikosti oljčnih sort primerljiva. Povprečno število alelov na lokus, povprečne vrednosti efektivnega števila alelov na lokus ter dejanske in pričakovane heterozigotnosti genskih markerjev EST-SSR so bile relativno visoke in primerljive z vrednostmi, ki smo jih določili pri genomskeh mikrosatelitskih markerjih. S tem smo potrdili, da so tudi genski mikrosateliti EST-SSR primerni za odkrivanje in proučevanje genetske raznolikosti oljke.

Skupna vrednost verjetnosti enakosti genotipov (PI) predstavlja verjetnost, da bosta imela dva naključno izbrana posameznika identičen genotip na vseh analiziranih lokusih in zaželeno je, da je vrednost verjetnosti blizu nič (Oliviera in sod., 2015). Za vse nove lokuse EST-SSR je skupna vrednost PI znašala  $2,10 \times 10^{-24}$ , kar je nižje od vrednosti PI, ki smo jo določili za 15 genomskeh mikrosatelitov ( $4,71 \times 10^{-12}$ ) ter nižje od vrednosti, o katerih poročajo v drugih študijah, ki so temeljile na genomskeh mikrosatelitih, npr. 19 sort oljk ( $1,433 \times 10^{-11}$ ) analiziranih s 14 lokusi SSR (Bandelj in sod., 2004), 68 oljčnih sort iz južne Italije ( $7,23 \times 10^{-14}$ ) analiziranih z 12 lokusi SSR (Marra in sod., 2013) in 561 akcesij iz 14 držav v Sredozemlju ( $2,55 \times 10^{-14}$ ) genotipiziranih z 12 lokusi SSR (Haouane in sod., 2011). Nizke skupne vrednosti PI novo razvitih markerjev EST-SSR in genomskeh mikrostalitskih markerjev potrjujejo, da sta oba markerska sistema primerna za razlikovanje analiziranih oljčnih sort.

Povprečna informacijska vrednost polimorfizma (PIC) je pri markerjih SSR znašala 0,679, povprečna vrednost PIC novih markerjev pa je v primeru pregledanih genotipov znašala 0,539, kar je nekoliko višje od povprečne vrednosti PIC (povprečje=0,511), ki so jo za 26 markerjev EST-SSR oljke izračunali Mariotti in sod. (2013), a nižje od povprečne vrednosti PIC (povprečje=0,648), ki so jo za 8 markerjev EST-SSR oljke določili De la Rosa in sod. (2013). Precej nižje povprečne vrednosti PIC so zabeležili v rodu citrusov (povprečje=0,450), pri granatnem jabolku (povprečje=0,381) in pri rožiču (povprečje=0,420) (Liu in sod., 2013; Jian in sod., 2012; La Malfa in sod., 2014). Markerji EST-SSR so bili sicer nekoliko manj polimorfni kot genomski markerji SSR, a povprečna vrednost PIC je bila pri obeh markerskih sistemih višja od 0,5, kar kaže na visok polimorfizem (Vaiman in sod., 1994) genskih in genomskeh mikrosatelitskih lokusov oljke. Ti rezultati potrjujejo, da so na novo razviti markerji EST-SSR zelo informativni in

primerni za študije raznolikosti oljke. Kar 30 na novo razvitih markerjev EST-SSR se je uvrstilo med informativne markerje ( $\text{PIC}>0,5$ ) in 9 med markerje, primerne za gensko kartiranje ( $\text{PIC}>0,7$ ). Na splošno je med temi 30 markerji 27 takih (OeUP-01, OeUP-02, OeUP-04, OeUP-05, OeUP-06, OeUP-08, OeUP-09, OeUP-11, OeUP-13, OeUP-14, OeUP-16, OeUP-18, OeUP-19, OeUP-20, OeUP-21, OeUP-22, OeUP-24, OeUP-26, OeUP-29, OeUP-30, OeUP-32, OeUP-34, OeUP-37, OeUP-39, OeUP-40, OeUP-42, OeUP-45), ki so še posebej priporočljivi, saj jih odlikuje nizka frekvenca ničnih alelov in ni zabeleženih odstopanj od Hardy-Weinbergovega ravnovesja. Vseh teh 27 markerjev EST-SSR bi bilo primernih za ugotavljanje raznolikosti oljk in za populacijske študije.

Pri genomskeh markerjih SSR so bile povprečne vrednosti vseh parametrov variabilnosti višje v primerjavi s povprečnimi vrednostmi, ki smo jih določili za markerje EST-SSR, kar je v skladu s predhodnimi raziskavami, kjer so primerjali uporabnost genskih in genomskeh markerjev SSR za proučevanje raznolikosti kumar (Hu in sod., 2011), topola (Song in sod., 2012) in ječmena (Chabane in sod., 2005; Zhang in sod., 2014). Le Liu in sod. (2013) so pri analizi citrusov ugotovili, da so vrednosti parametrov variabilnosti genomskeh (povprečno število alelov=4,04,  $H_o=0,200$ ,  $H_e=0,570$ ) in genskih markerjev SSR (povprečno število alelov=4,17,  $H_o=0,360$ ,  $H_e=0,560$ ) primerljive. Potrebno je poudariti, da so bile povprečne vrednosti parametrov variabilnosti markerjev EST-SSR pri drugih rastlinskih vrstah precej nižje v primerjavi z vrednostmi, ki smo jih določili za oljko (povprečno število alelov=4,5,  $H_o=0,649$ ,  $H_e=0,604$ ,  $\text{PIC}>0,539$ ). Različni parametri genetske variabilnosti so bili najnižji pri ječmenu (povprečno število alelov=2,59,  $\text{PIC}=0,370$ ) (Zhang in sod., 2014) ter nekoliko višji pri topolu (povprečno število alelov=2,8,  $H_o=0,233$ ,  $H_e=0,468$ ) (Song in sod., 2012) in kumarah (povprečno število alelov=3,38,  $\text{PIC}=0,397$ ) (Hu in sod., 2011). Povprečno število alelov in pričakovana heterozigotnost sta bili pri citrusih (povprečno število alelov=4,17,  $H_e=0,560$ ) in oljki (povprečno število alelov=4,5,  $H_e=0,604$ ) zelo podobni, vendar smo pri oljki zabeležili bistveno višjo povprečno dejansko heterozigotnost in informacijsko vrednost polimorfizma ( $H_o=0,649$ ,  $\text{PIC}=0,539$ ) v primerjavi s citrusi ( $H_o=0,360$ ,  $\text{PIC}=0,400$ ). Za oljko je značilna velika genetska raznolikost, kar je najverjetneje posledica (1) dolgega življenja oljke, ki se je pred domestikacijo razmnoževala s spontanim križanjem in s tem razvila visoko heterozigotnost (Zohary in Spiegel-Roy, 1975) ter (2) zgodnje domestikacije in ohranjanja genotipov tekom več stoletij gojenja (Fabbri in sod., 2009). Velika genetska raznolikost omogoča oljčnim sortam prilaganje v lokalnem okolju in hkrati pomembno vpliva na optimizacijo agronomске učinkovitosti teh sort v danih okoljskih razmerah (Muzzalupo in Perri, 2008).

Čeprav so markerji EST-SSR na splošno manj polimorfni kot genomski markerji SSR, so predhodne raziskave kulturnih rastlin pokazale, da se lahko markerje EST-SSR zelo uspešno uporabi za določanje genetske variabilnosti (Holton in sod., 2002; Fraser in sod., 2004; Kayesh in sod., 2013). Gupta in sod. (2003) so v svoji študiji zaključili, da so se

markerji EST-SSR, v primerjavi z genomske markerji SSR, izkazali kot primernejši za ugotavljanje raznolikosti 52 eksotičnih genotipov pšenice ter bolje prenosljivi med petimi vrstami žitaric in njihovimi divjimi sorodniki. Markerji EST-SSR naj bi bili celo bolj uporabni za razvoj kart genske povezanosti oz. za označevanje agronomsko pomembnih lastnosti (Huang in sod., 2011), ker se nahajajo v tistih regijah genoma, ki so bogate z geni (Varshney in sod., 2005b). Markerje EST-SSR se v zadnjih letih vse pogosteje uporablja za kartiranje genov, kar potrjuje razvoj kart genske povezanosti pri številnih agronomsko pomembnih vrstah, žitaricah (Varshney in sod., 2005c; Chen in sod., 2005), citrusih (Chen in sod., 2008), ananasu (Carlier in sod., 2012), leči (Kaur in sod., 2014), kavi (Ferrão in sod., 2015). Kadar so markerji EST-SSR povezani s pomembnim genom, so lahko zelo uporabni tudi za selekcijo s pomočjo markerjev (Liu in sod., 2013).

#### **5.4.2 Primerjava genskih in genomske mikrosatelitov pri proučevanju sorodnostnih odnosov in pri upravljanju kolekcij oljk**

Razvoj novih markerjev EST-SSR smo žeeli nadgraditi s testiranjem uporavnosti genskih markerjev pri proučevanju sorodnostnih odnosov oljčnih sort, ki se nahajajo v dveh nacionalnih kolekcijskih nasadih. V analizo smo vključili vseh 107 vzorcev oljk, ki so pripadale 24 referenčnim oljčnim sortam. Na osnovi Jaccardovih koeficientov podobnosti smo izdelali dva dendrograma, enega na osnovi rezultatov genotipizacije s 46 markerji EST-SSR in drugega na osnovi rezultatov genotipizacije s 15 genomske markerji SSR, saj smo žeeli primerjati oba markerska sistema. Za izdelavo dendrogramov smo uporabili metodo UPGMA, ki je najpogosteje uporabljen za filogenetske rekonstrukcije (Lowe in sod., 2004).

Razporeditev 24 referenčnih oljčnih sort v sorodnostne skupine je bila v primeru obeh markerskih sistemov podobna. Tako v dendrogramu EST-SSR, kot v dendrogramu SSR, se je jasno ločila skupina toskanskih sort, le sorte 'Leccione' je v dendrogramu SSR izpadla iz toskanske skupine. V obeh dendrogramih sta se v skupino toskanskih sort vključili še sorte 'Athena' in 'Zelenjak', za kateri se predvideva, da sta bili na obalo severnega Jadrana prinešeni iz osrednje Italije (Bandelj in sod., 2004). V primeru obeh markerskih sistemov se je skupini toskanskih sort pridružila še 'Črnica', ki naj bi prav tako izvirala iz osrednje Italije (Hugues, 1999). Rezultati so v skladu s predhodnimi raziskavami (Bandelj in sod., 2004), kjer so s pomočjo genomske markerjev in markerjev RAPD ugotavljali genetsko variabilnost oljčnih sort. Za najbolj zastopano lokalno sorto 'Itrska belica' se je, tako z genomske kot z genske mikrosatelitske markerji, izkazalo, da kaže izjemno nizko genetsko sorodnost z drugimi oljčnimi sortami, kar so potrdili že Bandelj in sod. (2004). Ti rezultati kažejo, da so tudi genski markerji EST-SSR primerni in uporabni za identifikacijo oljčnih sort ter za proučevanje sorodnostnih odnosov pri oljki. Tudi mnoge predhodne študije opisujejo potencialno uporabo markerjev EST-SSR za analizo genetske

variabilnosti gojenih genotipov sadnih vrst, npr. citrusov (Liu in sod., 2013), ananasa (Feng in sod., 2013), hrušk (Zhang in sod., 2014), za identifikacijo sort zelene solate (Hong in sod., 2015) ter za razlikovanje med gojenimi in divjimi genotipi pri ječmenu (Zhang in sod., 2014) in zeleni soji (Gupta in sod., 2014).

Rezultati so tudi pokazali, da je najbolj izstopajoča razlika med markerskima sistemoma ta, da smo z markerji EST-SSR identificirali 24 različnih genotipov, z genomskega mikrosateliti pa 27 različnih genotipov. Pri genomskega markerjih SSR je bilo število genotipov višje od števila oljčnih sort, ker smo z njimi odkrili genetske razlike znotraj sorte 'Ascolana tenera' in 'Santa Caterina'. Raznolikost znotraj sorte je lahko posledica mutacij na proučevanem lokusu ali poliklonskega značaja oljk. Običajno so poliklonske sorte oljk starejše gojene populacije, katerih razmnoževanje je potekalo v različnih kolekcijah iz divjih populacij, kar je privedlo do nastanka različnih genotipov (Fontanazza, 1993, cit. po Vergari in sod., 1998). V primerjavi z genomskega markerji SSR so bili markerji EST-SSR manj učinkoviti za razlikovanje med tesno povezanimi genotipi, kar je posledica manjšega polimorfizma markerjev EST-SSR (Gupta in Varshney, 2000). Razlike med dendrogramoma lahko pojasnimo tudi z dejstvom, da genomske in genske markerji SSR pokrivajo različne regije genoma oljke, kar vodi do različnih perspektiv genetske raznolikosti. Iz tega vidika se ta dva markerska sistema dopolnjujeta in verjetno odražata bolj realno sliko genetskih razdalj, kadar se ju uporabi v povezavi (Leigh in sod., 2003). Po mnenju Varshney in sod. (2005b) naj bi bili markerji EST-SSR primernejši za ocenjevanje funkcionalne raznolikosti, genomske markerji SSR pa zaradi večjega polimorfizma za iskanje prstnih odtisov DNA oz. za identifikacijo sort.

V naši raziskavi so se markerji EST-SSR izkazali kot primerno orodje za proučevanje genetske raznolikosti oljčnih sort in s tem kot uporabni za upravljanje genetskega materiala v kolecijskih nasadih oljk. A za upravljanje kolekcij bi bilo morda smiselno zasnovati primerno kombinacijo genomskega markerjev SSR in markerjev EST-SSR, ki bi omogočila tako razlikovanje med sortami, kot tudi znotraj sorte. Številne predhodne študije so že potrdile, da so mikrosatelitski markerji zelo učinkovit markerski sistem za upravljanje z rastlinskim materialom v kolecijskih nasadih oljk (Muzzalupo in sod., 2006; Omrani-Sabbaghi in sod., 2007; Belaj in sod., 2012; Trujillo in sod., 2013; Muzzalupo in sod., 2014; Zelasco in sod., 2014; Ipek in sod., 2015). Karakterizacija sort oljk z mikrosatelitskimi markerji je nadgradnja vrednotenja agronomskih in kakovostnih lastnosti in zagotavlja nove, dodatne informacije o posameznih genotipih. Poleg tega je izjemno pomembna tudi za ugotavljanje nepravilnosti pri poimenovanju sort, saj so pri oljki zelo pogosti sinonimi in homonimi. Nedavno je bila vzpostavljena tudi Podatkovna baza genetske diverzitete oljke (OGDD<sup>57</sup>), kjer poudarjajo pomen mikrosatelitskih markerjev za identifikacijo oljčnih sort in ugotavljanje pristnosti deviškega oljčnega olja, kar je izjemno

---

<sup>57</sup> Ang. Olive Genetic Diversity Database

pomembno z vidika zagotavljanja kakovosti in sledljivosti v celotni oljčni verigi (Ben-Ayed in sod., 2016).

Za lokuse obeh markerskih sistemov smo določili tudi statistično značilno odstopanje od Hardy-Weinbergovega ravnovesja in frekvenco ničnih alelov. Pri genomskeh markerjih SSR smo statistično značilno odstopanje od Hardy-Weinbergovega ravnovesja ugotovili pri 4 lokusih (27 %), pri markerjih EST-SSR pa pri 11 lokusih (24 %). O podobnih rezultatih poročajo tudi Mariotti in sod. (2016), saj so statistično značilno odstopanje od Hardy-Weinbergovega ravnovesja odkrili pri sedmih (27 %) markerjih EST-SSR oljke. Odstopanja so lahko posledica neenakomerne porazdelitve alelov, kar se je v naši raziskavi odrazilo v visokem številu homozigotov in/ali visokem številu ene kombinacije identičnih alelov, opažene pri večini oljčnih sort. Odstopanje od Hardy-Weinbergovega ravnovesja na omenjenih lokusih lahko prispeva k pristranskim ocenam verjetnosti, zato jim je potrebno posvetiti posebno pozornost pri analizah identitete in starševstva, kot tudi pri populacijskih študijah (Pemberton in sod., 1995; Cipriani in sod., 2002). Do odstopanja od Hardy-Weinbergovega ravnovesja lahko pride tudi zaradi prisotnosti ničnih alelov, ki se jih včasih lahko zazna kot presežek homozigotov. Visoke vrednosti frekvenc ničnih alelov ( $F(null) > 0,2$ ) (Dakin in Avise, 2004) smo odkrili pri enem lokusu SSR (7 %) in pri šestih lokusih EST-SSR (13 %), kar kaže na večjo možnost prisotnosti ničnih alelov. Za nastanek ničnih alelov so odgovorne predvsem mutacije na mestih prileganja začetnih oligonukleotidov, ki preprečijo vezavo začetnih oligonukleotidov in s tem pomnoževanje mikrosatelita (Pemberton in sod., 1995). Zaradi prisotnosti ničnih alelov se lahko pri določenih študijah pojavijo težave, kot so pristranska ocena genetske raznolikosti v populaciji (Chapuis in Estoup, 2007), nepravilna določitev staršev v starševskih analizah (Dakin in Avise, 2004), pristranska ocena genetske raznovrstnosti med populacijami in manjša verjetnost pravilnega razvrščanja posameznikov v populacijah (Carlson, 2008) ter navidezno višja stopnja parjenja v sorodstvu (DeWoody in sod., 2006). Pri dobljenih rezultatih preseneča, da so le-ti zelo podobni tako za genomske markerje SSR, kot za markerje EST-SSR, kljub dejству, da naj bi bile nekodirajoče regije DNA bolj podvržene mutacijam. Tudi drugi avtorji so pri proučevanju raznolikosti oljčnih sort z genomske markerji SSR odkrili zelo malo lokusov z visokimi vrednostmi ničnih alelov. Poljuha in sod. (2008) so pri analizi 27 hrvaških oljčnih sort z 12 markerji SSR odkrili en lokus (8 %), prav tako Marra in sod. (2013) pri analizi 68 italijanskih sort z 12 mikrosateliti. Abdessemed in sod. (2015) pa so pri proučevanju 26 alžirskeh sort oljk z 11 mikrosateliti odkrili dva lokusa (18 %) z visokimi vrednostmi ničnih alelov.

Sposobnost razlikovanja genskih in genomskeh markerjev smo določili z izračunom minimalnega števila markerjev, ki so potrebni za razlikovanje vseh ugotovljenih genotipov. Izkazalo se je, da že dva lokusa EST-SSR (OeUP-04 in OeUP-14) zadoščata za nedvoumno razlikovanje vseh 24 genotipov v našem vzorcu. Mariotti in sod. (2016) so ugotovili, da za razlikovanje vseh (32) sort oljk zadostujejo trije markerji EST-SSR, kar je

v skladu s pričakovanji, saj so v analizo vključili večje število oljčnih sort. Za razlikovanje vseh 27 genotipov z genomske markerji SSR sta prav tako zadostovala dva lokusa SSR (DCA9 in DCA11). Za lokus DCA11 sta znani dve pomanjkljivosti, nestabilna struktura mikrosatelitskega motiva (Sefc in sod., 2000) in slabše pomnoževanje daljšega alela, kar lahko vodi do presežka homozigotov (Bandelj in sod., 2002, Poljuha in sod., 2008). Lokus DCA11 tudi ni uvrščen na seznam priporočenih mikrosatelitskih markerjev oljke (Baldoni in sod., 2009), zato smo izvedli ponovno analizo brez lokusa DCA11. Rezultati so pokazali, da za nedvoumno razlikovanje 27 genotipov oljk zadoščajo trije lokusi (DCA9, DCA16 in DCA18). Visoka sposobnost razlikovanja obeh markerskih sistemov je bila potrjena tudi z velikim številom opaženih genotipov na posameznem lokusu, vključno s prisotnostjo edinstvenih genotipov. Poleg tega smo pri genomskej markerjih SSR odkrili 21 (21 %) sortno specifičnih alelov in z markerji EST-SSR 29 (14 %). Tudi Mariotti in sod. (2016) poročajo o prisotnosti specifičnih oz. redkih alelov pri markerjih EST-SSR oljke. Sortno specifični aleli markerjev EST-SSR predstavljajo dodano vrednost genskih markerjev pri genotipizaciji, odkrivanju specifičnih sort in pri ugotavljanju potvor oljčnega olja (Mariotti in sod., 2016).

Nove markerje EST-SSR odlikujejo dobra sposobnost razlikovanja, nizke vrednosti frekvenc ničnih alelov in visoka informativnost, ki bi jo bilo smiselno proučiti za nadaljnjo identifikacijo oljčnih sort. Ti rezultati potrjujejo, da so novi markerji EST-SSR primerni za odkrivanje raznolikosti in za upravljanje z genskimi viri oljke v kolekcijskih nasadih, genskih bankah in drevesnicah. Kljub temu je potrebno upoštevati, da so se markerji EST-SSR izkazali nekoliko manj polimorfni kot genski markerji SSR, saj z njimi nismo uspeli odkriti raznolikosti znotraj oljčnih sort. Predpogoj za proučevanje sorodnostnih odnosov in upravljanje z genskimi viri oljke je natančno in zanesljivo ocenjevanje genetske raznolikosti. Le s premišljenim izborom mikrosatelitskih markerjev, ki izhajajo iz različnih regij genoma, lahko zagotovimo natančno in objektivno ocenjevanje genetske raznolikosti (Song in sod., 2012).

## 5.5 IZDELAVA STARŠEVSKEGA TESTA Z MARKERJI EST-SSR IN DOLOČITEV NAJPOGOSTEJŠIH OPRAŠEVALNIH SORT ‘ISTRSKE BELICE’

Z novimi markerji EST-SSR smo želeli razviti test starševstva za ‘Istrsko belico’ in ugotoviti njene najpogosteje oprševalne sorte. Starševstvo se lahko proučuje z metodo pomnoževanja mikrosatelitskih markerjev, ki temelji na ugotavljanju prisotnosti alelov staršev pri potomcih. Pri rastlinah so mikrosatelitski markerji najprimernejši za starševsko analizo, saj jih odlikuje kodominantnost, kar omogoča enostavno razlikovanje med genetsko podobnimi posamezniki. Analiza starševstva je zelo primerna metoda za določanje očetovstva v žlahniteljskih programih različnih rastlin (Buteler in sod., 2002).

Poleg tega velja za temeljno orodje pri proučevanju dedovanja in pri ugotavljanju spolne kompatibilnosti rastlin (Seifi, 2008).

Večina oljčnih sort je po podatkih samoneoplodnih ali delno samoneoplodnih, zato potrebujejo za uspešno oploditev kompatibilno oprševalno sorto. V slovenskih oljčnikih je najbolj zastopana sorta 'Istrska belica' in predstavlja kar 65 % vseh oljčnih dreves. Pridelovalci opozarjajo, da se pri tej sorti na določenih lokacijah pojavljajo težave z rodnostjo. Za 'Istrsko belico' je splošno razširjeno dejstvo, da je samooplodna, kar pomeni, da za oplodnjo ne potrebuje drugih oprševalnih sort. Kljub temu jo v literaturi opisujejo kot delno samooplodno in celo navajajo, da je oplodnja bistveno boljša v primeru tujega oprševanja (Sancin, 1990; Ugrinović in Štampar, 1996). V naši raziskavi smo žeeli s starševskim testom in markerji EST-SSR določiti najpogosteje oprševalne sorte 'Istrske belice' ter ugotoviti, v kolikšni meri se sorte dejansko sama oplodi. Zastavili smo dvoletni poskus, ki je vključeval dva različna oljčna nasada, enosortni nasad 'Istrske belice' in kolekcijski nasad.

Za izdelavo starševskega testa z mikrosatelitskimi markerji sta predpogoja visoka kakovost in zadostna koncentracija DNA. V naši raziskavi smo za izolacijo DNA iz oljčnih embrijev uporabili metodo, ki sta jo objavila Guerin in Sedgley (2007), a smo jo nekoliko modificirali. Glavna razlika je bila v tem, da smo čas precipitacije DNA v zamrzovalniku podaljšali iz 30 minut na 1 uro in 30 min. Modifikacija je pripomogla k uspešnejši izolaciji DNA in k višjim koncentracijam izolirane DNA. Kljub optimizaciji protokola izolacije DNA nismo uspeli iz vseh vzorčenih embrijev izolirati zadostne količine DNA za nadaljnje analize. V Ospu je bila izolacija DNA uspešna pri povprečno 52 % in v Strunjanu pri povprečno 37 % vzorčenih embrijev. Sledilo je pomnoževanje DNA embrijev z visoko polimorfnimi markerji EST-SSR, ki prav tako ni bilo uspešno pri vseh analiziranih vzorcih, zato je določen odstotek vzorcev izpadel iz nadaljnje analize. Skupno smo v Ospu genotipizirali 100 vzorcev embrijev (2012=37; 2013=63) in v Strunjanu 63 vzorcev embrijev (2012=17; 2013=46). Izolacija DNA in nadaljnje pomnoževanje DNA embrijev nista bili sto odstotno uspešni. Za rastline so značilni številni sekundarni metaboliti (terpenoidi, fenolne spojine, dušik vsebujoče snovi), ki imajo največkrat vlogo obrambnih ter signalnih molekul in delujejo tudi kot inhibitorji. Polifenoli lahko s svojim inhibitornim delovanjem otežujejo izolacijo DNA, ker ovirajo lizo celičnih membran in povzročajo razpad nukleinskih kislin. V reakciji PCR pa ovirajo delovanje DNA-polimeraze in posledično uspešno pomnoževanje tarčne molekule DNA. Izolacijo DNA in reakcijo PCR lahko ovirajo tudi polisaharidi, encimi in različne beljakovine rastlinskega izvora, ker vežejo ali razgrajujejo DNA in ovirajo delovanje DNA-polimeraze (Wilson, 1997). Znano je, da so tudi v celicah embrijev oljke nakopičena lipidna telesca, ki vsebujejo endo- in ekso-peptidaze (Zienkiewicz in sod., 2011), in velike količine beljakovin (Germaná in sod., 2014), ki so lahko vplivali na uspešnost izolacije DNA in pomnoževanje DNA embrijev oljke v reakciji PCR.

V obeh proučevanih nasadih sta bili izolacija DNA iz oljčnih embrijev in pomnoževanje DNA embrijev uspešnejši v letu 2013 kot v letu 2012. Vzrok za to so lahko tudi vremenske razmere v rastni sezoni. Po podatkih Agencije RS za okolje, je leto 2012 zaznamovala kmetijska suša, za katero je bilo najbolj kritično obdobje od zadnje dekade junija do zadnje dekade avgusta (ARSO, 2012). Tudi s statistično analizo meteoroloških podatkov, v obdobju od meseca marca do konca julija, smo ugotovili, da so se na obeh proučevanih lokacijah vrednosti maksimalne temperature zraka in količine padavin statistično značilno razlikovale med letoma 2012 in 2013. V Strunjanu in Ospu sta bili povprečni vrednosti maksimalne temperature zraka (Tmax) za približno 2 °C višji v primerjavi z letom 2013 in povprečna količina padavin je bila na obeh lokacijah leta 2012 manjša za približno 1-2 mm. Rastline imajo razvite številne obrambne mehanizme proti stresnim okoljskim dejavnikom, kamor sodijo tudi visoke temperature in pomanjkanje padavin. Posledica je sinteza sekundarnih metabolitov, ki se nahajajo tudi v embriju in semenskih ovojnicih in lahko vplivajo na uspešnost izolacije in na nadaljnje pomnoževanje DNA, izolirane iz embrijev (Hoffman in Krueger, 2009). Kmetijska suša leta 2012 in visoke temperature so lahko vplivale tudi na rast in razvoj embrijev 'Istrske belice' ter sintezo sekundarnih metabolitov. Pri oljki ločimo pet razvojnih faz ploda: oploditev in zasnova ploda, razvoj semena, otrdelost semena oz. koščice, razvoj mesnatega mezokarpa in dozorevanje. Za razvoj embrija je ključna prva faza, ki vključuje oploditev in zasnova ploda, traja do 30 dni po cvetenju, zanjo pa je značilna hitra delitev celic in pospešena rast embrija (Conde in sod., 2008). Leta 2012 je 'Itrska belica' cvetela zadnje dni v maju in prve dni v juniju, kar pomeni, da je šlo za časovno prekrivanje razvoja embrijev in sušnega obdobja. Za oljko sicer velja, da dobro prenaša sušo, a v določenih obdobjih je tudi zanjo ključnega pomena zadostna količina vode. Ustrezna količina vode je za oljko nujno potrebna pozno pozimi za dobro prirast ter spomladi in zgodaj poleti za razvoj cvetnih brstov. Tudi v času cvetenja in formiranja plodov je prav tako pomembna primerna vlažnost (Whitmore, 2000). Oljčna drevesa, ki smo jih vključili v našo raziskavo, so bila v letu 2012 izpostavljena suši, saj nobeden od proučevanih nasadov ni imel nameščenega namakanega sistema.

Za določitev najpogostejših opraševalnih sort 'Istrske belice' smo izbrali sedem novih markerjev EST-SSR, ki jih je odlikovalo veliko število alelov, visoka stopnja polimorfizma, nizke frekvence ničnih alelov in niso odstopali od Hardy-Weinbergovega ravnovesja. Na podlagi rezultatov genotipizacije embrijev s sedmimi lokusi EST-SSR smo izračunali različne parametre genetske variabilnosti. Povprečne vrednosti parametrov genetske variabilnosti se na posamezni lokaciji med letoma 2012 in 2013 niso bistveno razlikovale. Med lokacijama Strunjan in Osp je najbolj izstopala razlika v številu pomnoženih različnih alelov. V Strunjanu se je leta 2012 in 2013 pomnožilo več alelov, kar je bilo pričakovano, saj je v Strunjanu kolekcijski nasad in je bilo v neposredni bližini analiziranih dreves več različnih potencialnih opraševalnih sort, kot v enosortnem nasadu 'Istrske belice' v Ospu. Vsi izračunani parametri genetske variabilnosti, z izjemo povprečne dejanske heterozigotnosti, so bili pri embrijih nižji kot pri starševski populaciji,

saj so imeli po materini liniji vsi embriji identičen genotip. Pri starševski populaciji smo izračunali še dva dodatna parametra: verjetnost izključitve (EP) in verjetnost enakosti genotipov (PI), s pomočjo katerih lahko ovrednotimo primernost izbranih molekulskih markerjev za starševsko analizo (Waits in sod., 2001, Vandepitte, 2012). Visoka vrednost parametra EP (0,998) je potrdila, da je bil izbran set markerjev, primeren za izključitev skoraj vseh (99,8 %) tistih donorjev peloda, ki niso imeli dovolj podobnosti z danim potomcem oz. embrijem. Primernost izbranih markerjev so potrdile še zelo nizke vrednosti parametra PI, ki kažejo na to, da je bila verjetnost določitve napačnega donorja peloda zelo majhna. Te vrednosti potrjujejo, da izbran set markerjev EST-SSR odlikuje dobra informativnost in visoka sposobnost izključevanja napačnih donorjev peloda. Sedem premišljeno izbranih markerjev EST-SSR je v naši analizi zadostovalo za zanesljivo določitev najpogostejših oprševalnih sort 'Istrske belice'. Različni avtorji so za izdelavo starševskega testa pri olki uporabili štiri (De la Rosa in sod., 2004) ali osem genskih markerjev SSR (Mookerjee in sod., 2005, Seifi in sod., 2012) ter štiri markerje EST-SSR (De la Rosa in sod., 2013). Prav tako so za izdelavo starševskega testa pri rdečem boru zadostovali štirje genski markerji SSR (Robledo-Arnuncio in Gil, 2005) ter šest markerjev SSR pri evkaliptusu (Chaix in sod., 2003). Predhodne študije pri olki in drugih drevesnih vrstah kažejo, da za izdelavo starševskega testa zadostuje že nekaj mikrosatelitskih lokusov. Poleg tega naj bi na parameter EP pozitivno vplivalo tudi veliko število alelov z nizko frekvenco in njihova razporeditev, kar je značilno za mikrosatelitske lokuse (Chaix in sod., 2003).

Uporaba molekularnih tehnik za analize starševstva je v veljavi že več kot desetletje. Pomemben tehnološki preboj je predstavljala uvedba mikrosatelitskih markerjev skupaj z razvojem in izboljšavami statističnih metod za starševske analize (Jones in sod., 2010). V naši raziskavi smo s pomočjo genskih mikrosatelitskih markerjev izdelali starševski test in določili najpogostejše oprševalne sorte 'Istrske belice'. Uporabili in primerjali smo tri različne računalniške programe, FAMOZ, CERVUS in PARENTE. Potencialne oprševalne sorte 'Istrske belice' smo uspeli določiti z vsemi programi, le da so se odstotki embrijev z določeno oprševalno sorto nekoliko razlikovali. S programom CERVUS smo v Ospu (32,4 % v 2012, 33,3 % v 2013) in v Strunjanu (41,2 % v 2012, 52,2 % v 2013) določili najmanj potencialnih oprševalnih sort. Najvišji odstotek embrijev z določeno oprševalno sorto smo v Strunjanu dobili s programom FAMOZ (64,7 % v 2012, 65,2 % v 2013) in v Ospu s programom PARENTE (45,9 % v 2012, 66,7 % v 2013). Poleg tega določenemu odstotku embrijev nismo uspeli določiti nobene potencialne oprševalne sorte. Odstotek embrijev brez določenega donorja peloda je bil na obeh proučevanih lokacijah najvišji s programom PARENTE (v Ospu povprečno 43,7 %, v Strunjanu povprečno 44,2 %), bistveno nižji s programom CERVUS (v Ospu povprečno 26,1 %, v Strunjanu povprečno 8,4 %) in zanemarljiv s programom FAMOZ (v Ospu povprečno 4,1 %, v Strunjanu povprečno 4,1 %). Tudi pri proučevanju vzorca oprševanja petih oljčnih sort na jugu Avstralije (Mookerjee in sod., 2005) so ugotovili 22 % embrijev brez določenega

donorja peloda. Sklepamo lahko, da so bili cvetovi teh vzorcev oplojeni s pelodom neidentificiranih genotipov znotraj oljčnega nasada ali s pelodom dreves, ki se nahajajo v bližini nasadov. V Strunjanu in Ospu so oljčniki tako v neposredni bližini proučevanih nasadov, kot tudi v bolj oddaljeni okolici, od koder so lahko zračne mase prinesle pelod neidentificiranih genotipov. Embrije brez določenega donorja peloda smo na obeh lokacijah določili v letu 2012 in 2013, kar prav tako potrjuje, da je bilo v oplodnjo 'Istrske belice' vključenih več neznanih genotipov oljke.

Sorte, ki smo jih določili kot najverjetnejše oprševalne sorte 'Istrske belice', se med uporabljenimi računalniškimi programi niso bistveno razlikovale. Z vsemi tremi računalniškimi programi se je v Ospu leta 2013 kot najpogostejsa oprševalna sorta izkazala sorta 'Frantoio' in v Strunjanu leta 2012 sorta 'Leccino'. Leta 2012 smo s programom FAMOZ v Ospu kot najpogostejo oprševalno sorto določili sorto 'Leccino', z drugima dvema programoma pa 'Črnico'. In leta 2013 smo v Strunjanu s programom FAMOZ prav tako določili sorto 'Leccino', z drugima dvema programoma pa sorto 'Picholine'. Generalno smo z vsemi tremi računalniškimi programi dobili zelo podobne rezultate, kar je v skladu s študijo, v kateri so Harrison in sod. (2013) primerjali različne računalniške programe in zaključili, da rezultati starševskega testa niso v veliki meri odvisni od uporabljenega računalniškega programa. Natančnost oz. verodostojnost rezultatov naj bi bila odvisna predvsem od števila in variabilnosti uporabljenih lokusov, od nepopolnega vzorčenja vseh potencialnih staršev in od napak pri genotipizaciji. Pri analizi starševstva je potreben skrben premislek o izbiri markerjev, torej o številu in kakovosti, s čimer lahko povečamo natančnost rezultatov in zmanjšamo posledice nepopolnega vzorčenja starševske populacije (Harrison in sod., 2013). Poudariti velja, da se je v naši analizi najbolje izkazal program FAMOZ, saj smo le z njim odkrili štiri primere samooplodnje pri 'Istrski belici'. Prednost programa FAMOZ je tudi v tem, da izračuna verjetnost enakosti genotipov (PI) in verjetnost izključitve (EP). Poleg tega omogoča uporabo kodominantnih ali dominantnih in celo plastidnih markerjev, programa CERVUS in PARENTE pa se uporablja predvsem za kodominantne markerje (Weising in sod., 2005).

Analiza starševstva je pokazala, da je bila v Ospu leta 2012 najpogostejsa oprševalna sorta 'Istrske belice' sorta 'Črnica' oz. 'Leccino' in leta 2013 sorta 'Frantoio'. Po naših podatkih se v eksperimentalnem nasadu nahaja sorta 'Leccino'. Čeprav je zastopana samo z enim drevesom, je potencialni vir peloda za 'Istrsko belico'. Dejstvo pa je, da so vse sorte razširjene v oljčnih nasadih Slovenske Istre in so lahko prispevale svoj pelod tudi na daljše razdalje s pomočjo zračnih tokov. Pelodna zrna oljke lahko namreč od izvornega drevesa z zračnimi masami prepotujejo tudi razdaljo 12 km (Fabbri in sod., 2004). V Strunjanu je bila leta 2012 najpogostejsa oprševalna sorta 'Leccino' in v letu 2013 sorta 'Picholine' oz. 'Leccino'. V kolekcijskem nasadu v Strunjanu so v bližini (približno na razdalji 20 m) proučevanih dreves 'Istrske belice' drevesa sorte 'Picholine', poleg tega pa

se kolekcijski del nasada nadaljuje v nasad, kjer so izključno drevesa sort 'Leccino' in 'Itrska belica'. Kot najboljša opraševalna sorta 'Itrske belice' se je sorta 'Leccino' izkazala tudi v študiji, ki sta jo naredila Ugrinović in Štampar (1996). V svoji raziskavi sta proučevala uspešnost oploditve oljčnih sort 'Itrska belica', 'Pendolino' in 'Leccino', v primeru samooprašitve, naravne oprašitve in navzkrižne oprašitve ter ugotavljala stopnjo samooplodnosti analiziranih sort. Zaključila sta, da je 'Leccino' najboljša opraševalna sorta 'Itrske belice', čeprav je v cvetenju zaostajala 3 do 4 dni za 'Itrsko belico'. Medtem ko se je v naši nalogi, v letu 2012 in 2013, obdobje cvetenja obeh sort časovno popolnoma prekrivalo. Sorta 'Leccino' se je v njuni študiji izkazala tudi kot dobra opraševalna sorta za sorto 'Pendolino'. Najpogosteje opraševalne sorte 'Itrske belice', ki smo jih določili v raziskavi, kažejo, da sta sorti 'Leccino' in 'Frantoio' kompatibilni z 'Itrsko belico'.

V skladu s pričakovanji so se najpogosteje opraševalne sorte nekoliko razlikovale med proučevanima oljčnima nasadoma, kar je lahko posledica različnega nabora sort v neposredni bližini analiziranih dreves. Iz rezultatov je razvidno, da med sortami, ki smo jih določili kot najpogosteje donorje peloda 'Itrske belice', prevladujejo sorte, ki izvirajo iz Toskane z aleli, značilnimi za toskansko dednino. V različnih študijah so s pomočjo mikrosatelitskih markerjev potrdili skupno genetsko osnovo toskanskih oljčnih sort (Bandelj in sod., 2004; Cantini in sod., 2008). Tudi v naši raziskavi so se z genskimi mikrosateliti EST-SSR vse toskanske sorte razvrstile v enotno skupino, ki se ji je pridružila še sorta 'Črnica', za katero so Bandelj in sod. (2004) dokazali, da izvira iz Italije. Poleg tega, da so se sorte, določene kot najpogosteje opraševalne sorte 'Itrske belice', razlikovale med eksperimentalnima oljčnikoma, so bile v posameznem nasadu razlike tudi med obravnavanimi letoma. Razlog za to so najverjetnejše okoljski dejavniki, predvsem visoke temperature v letu 2012 in suša, na katero je vplival že jesenski primanjkljaj padavin leta 2011, ki je na Primorskem v letu 2012 samo še naraščal (Sušnik in Valher, 2012). Visoke temperature lahko skrajšajo obdobje receptivnosti brazde pestiča, inhibirajo kaljivost oljčnega peloda (Martin in sod., 2005) in upočasnijo ali ustavijo rast pelodnega mešička (Koubouris in sod., 2009). Spremenljivi okoljski dejavniki lahko vplivajo tudi na obdobje trajanja polnega cvetenja pri posamezni oljčni sorti. To se je pokazalo tudi v naši raziskavi v oljčnem nasadu v Strunjanu, kjer se je obdobje trajanja polnega cvetenja 'Itrske belice' leta 2012 popolnoma prekrivalo s trajanjem polnega cvetenja sorte 'Leccino' in leta 2013 s trajanjem polnega cvetenja sorte 'Picholine'. Tudi Eassa in sod. (2011) so pri proučevanju samo(ne)kompatibilnost sorte 'Kalamata' zaključili, da se lahko produktivnost enosortnega oljčnika izboljša, če so prisotni kompatibilni donorji peloda. Poleg tega svetujejo, da se v komercialne oljčne nasade ne vključi samo enega kompatibilnega opraševalca, temveč je najbolje tri do štiri, in sicer prav zaradi tega, ker obdobje cvetenja in viabilnost peloda variirata med leti. Za potrditev najučinkovitejših opraševalnih sort 'Itrske belice' bi bilo v obeh nasadih potrebno izvajati starševski test več zaporednih let, ker lahko na uspešnost opraševanja in oploditve vplivajo ekološki dejavniki. Poleg tega bi bilo analizo starševstva z mikrosatelitskimi markerji smiselno

nadgraditi s sodobnimi metodami fluorescentne mikroskopije, ki omogočajo proučevanje parametrov efektivnega časa oprševanja in kaljivosti peloda, s čimer bi lahko natančneje proučili biologijo oprševanja 'Istrske belice'.

O stopnji samo(ne)kompatibilnosti 'Istrske belice' je na voljo zelo malo podatkov, zato smo leta 2013 v Ospu in Strunjanu cvetove izolirali z oprševalnimi vrečkami in nato število samooplojenih plodov primerjali z odprto opršitvijo. Na obeh lokacijah je bil odstotek razvitih plodov znotraj oprševalnih vrečk manjši kot na odkritih poganjkih, vendar ne bistveno manjši. V Ospu se je znotraj oprševalnih vrečk razvilo 0,36 % manj plodov in v Strunjanu 0,56 % manj plodov. Podobno je bilo ugotovljeno že pri številnih oljčnih sortah iz različnih pridelovalnih območij (Lavee in sod., 2002; Al-Kasabeh in sod., 2005; Cuevas in sod., 2009; Vuletin Selak in sod., 2011). Indeks samonekompatibilnosti (ISI) je definiran kot razmerje med številom samooplojenih plodov ter številom plodov, ki so rezultat odprtrega oprševanja (Zapata in Arroyo, 1978). Indeks SI je primeren za oceno stopnje samonekompatibilnosti pri rastlinskih vrstah (Vuletin Selak in sod., 2011), zato smo ga izračunali tudi za 'Istrske belice'. Če je vrednost indeksa SI manjša od 0,2, je sorta samonekompatibilna in, če je indeks SI enak ali večji od 1, je sorta samokompatibilna. Vrednosti med 0,2 in 1 opredelijo sorto kot delno samonekompatibilno. V kolekcijskem nasadu v Strunjanu je indeks SI znašal 0,6 in v enosortnem nasadu v Ospu 0,9. Nekoliko višja vrednost indeksa SI v Ospu je posledica dejstva, da je v Ospu enosortni nasad 'Istrske belice' in zato večja verjetnost samooplodnje. Vrednosti indeksa SI sta bili na obeh lokacijah med 0,2 in 1, zato se je sorta 'Istrska belica' izkazala kot delno samonekompatibilna. Nizka stopnja samooploditve, ki smo jo ugotovili pri 'Istrski belici', je do neke mere presenetljiva, saj je sorta v praksi poznana kot samooplodna. Že Sancin (1990) je navajal, da je oploditev bistveno boljša v primeru tujega oprševanja. Relativno nizko stopnjo samooplodnosti (0,21 %) te sorte sta potrdila tudi Ugrinović in Štampar (1996). Tudi v svetovnem katalogu oljčnih sort (World Catalogue of Olive Varieties, IOOC) (Barranco in sod., 2000) je 'Istrska belica' opisana kot delno samokompatibilna. Čeprav za oljke na splošno velja, da so samokompatibilne, je za mnoge sorte znano, da se v določenih podnebnih razmerah pojavi težave z oprševanjem in posledično s pridelkom. Številne študije poročajo, da so predvsem visoke temperature (30 °C - 35 °C) ključen dejavnik, ki določa raven samo(ne)kompatibilnosti pri oljkah (Lavee in sod., 2002; Seifi in sod., 2008; Koubouris in sod., 2009; Spinardi in sod., 2012; Vuletin Selak in sod., 2013). Visoke temperature lahko upočasnijo razvoj peloda (Ayerza in Coates, 2004), inhibirajo kalitev lastnega peloda (Koubouris in sod., 2009), med tem ko imajo v primeru opršitve s tujim pelodom manjši vpliv na rast pelodne cevke (Lavee in sod., 2002). Pri določanju samo(ne)kompatibilnosti oljčnih sort prihaja pogosto do kontradiktornih rezultatov (Seifi in sod., 2015) in številni avtorji so si enotni, da je razlog za to v dejstvu, da stopnja samo(ne)kompatibilnosti variira med pridelovalnimi območji in med leti (Lavee in sod., 2002; Vuletin Selak in sod., 2011; Koubouris in sod., 2014). Poleg tega pa je izbira

optimalnih oprševalnih sort za vodilne oljčne sorte nekoliko otežena tudi zaradi stalnega uvajanja tujih sort v nove okoljske razmere (Selak in sod., 2014).

Tudi rezultati genotipizacije embrijev z markerji EST-SSR, ki so se razvili znotraj oprševalnih vrečk, so pokazali, da je 'Istrska belica' delno samonekompatibilna. Izmed vseh plodov, ki so se razvili v oprševalnih vrečkah, smo v Ospu samooploditev potrdili pri 86,4 % plodov, v Strunjanu pa je bilo samooplojenih 80 % plodov. Znotraj oprševalnih vrečk je torej prišlo do kontaminacije s pelodom drugih oljčnih sort, najverjetneje zato, ker smo uporabili bombažne vrečke. Različni materiali, ki se jih uporablja za oprševalne vrečke, zagotovo preprečujejo vnos peloda z biotskimi vektorji, vendar so različno permeabilni za pelod, ki se prenaša z vetrom. V eni od raziskav so ugotovili, da je bombažna tkanina skoraj povsem nepropustna kot filter tkanina, vendar se lahko velikost por v tkanini spremeni oz. poveča zaradi mehanskih poškodb, ki jih npr. povzročijo sosednje veje, veter, dež. Za pelodna zrna je 100 % nepropustna filter tkanina, pri kateri pa je težava v tem, da se lahko pogoji znotraj vrečke bistveno razlikujejo od zunanjih razmer (Neal in Anderson, 2004), kar lahko občutno vpliva na uspešnost samooploditve pri analizirani oljčni sorti.

Nizka stopnja samooploditve, ki smo jo odkrili pri odprttem oprševanju sorte 'Istrska belica', kaže, da se sorta preferenčno oplodi s tujim pelodom. To smo potrdili tudi z rezultati starševskega testa, saj smo v obeh proučevanih letih med vsemi analiziranimi embriji odkrili samo 4 primere samooploditve. Moutier in sod. (2001) so proučevali kompatibilnost 16 oljčnih sort in odkrili, da jih večina za ustrezni pridelek potrebuje navzkrižno oprševanje. Tudi Lavee in sod. (2002) so ugotovili, da so pri sortah, ki so sicer sposobne samooploditve, letni pridelki višji v primeru navzkrižnega oprševanja. Vsi ti rezultati potrjujejo, da so različne sorte oljk večinoma samoneoplodne, kar se odraža tudi v visoki stopnji heterozigotnosti in polimorfizmu DNA med posamezniki (Rallo in sod., 2000).

## 6 SKLEPI

V okviru doktorskega dela smo v transkriptomu razvijajočega plodu oljke sorte 'Istrska belica' odkrili 984 mikrosatelitev. Približno 1 % izraženih nukleotidnih zaporedij (ESTs) je vsebovalo mikrosatelitske markerje, med katerimi so prevladovali di- in tri-nukleotidi, odkrili pa smo tudi tetra-, penta- in heksa-nukleotidne mikrosatelite. Najpogosteji dinukleotidni motiv je bil GA/TC in trinukleotidni GAA/TTC. Izmed vseh odkritih mikrosatelitev smo uspešno razvili 46 novih markerjev EST-SSR. S tem smo pomembno prispevali k večji razpoložljivosti genskih markerjev pri oljki. Vsi podatki o zaporedjih ESTs in o novo razvitih parih začetnih oligonukleotidov genskih markerjev so preko javno dostopne podatkovne baze NCBI na voljo tudi drugim raziskovalnim skupinam in bodo tako lahko prispevali k boljšemu poznavanju strukturne in funkcijsko genomike pri oljki.

Na podlagi primerjave parametrov variabilnosti genskih in genomskeh mikrosatelitskih markerjev oljke smo potrdili hipotezo, da so genski mikrosateliti manj polimorfni. A potrebno je poudariti, da so bili pri oljki parametri variabilnosti znatno višji v primerjavi z drugimi kmetijskimi rastlinami. Vseh 46 novih markerjev EST-SSR odlikuje visoka stopnja polimorfizma. Zato menimo, da bodo zelo primerni za proučevanje genskih virov oljke, saj omogočajo neposredno oceno funkcionalne biotske raznolikosti. Set novih markerjev ne bo samo povečal razpoložljivosti markerjev EST-SSR oljke, temveč bo lahko v pomoč v bodočih programih žlahtnjenja oljke in pri izdelavi vezanih genskih kart. Poleg tega bo z njihovo pomočjo mogoče raziskovati določene biokemijske poti pri oljki. Markerji EST-SSR so prenosljivi med sorodnimi vrstami, zato bodo lahko koristni tudi na področju primerjalne genomike.

Karakterizacija sort oljk z mikrosatelitskimi markerji je nadgradnja vrednotenja agronomskih in kakovostnih lastnosti in zagotavlja nove, dodatne informacije o posameznih genotipih. Primerjava genskih in genomskeh markerjev pri proučevanju sorodnostnih odnosov ter pri upravljanju kolekcij oljk je pokazala, da so tudi markerji EST-SSR dobro orodje za nedvoumno identifikacijo oljčnih genotipov, za proučevanje sorodnostih odnosov oljčnih sort ter za pregled in upravljanje nacionalnih kolekcijskih nasadov. Kot pomanjkljivost markerjev EST-SSR je potrebno izpostaviti, da z njimi nismo uspeli odkriti raznolikosti znotraj oljčnih sort 'Ascolana tenera' in 'Santa Caterina'. Zaključimo lahko, da imata oba markerska sistema zelo podobne možnosti glede uporabe, pri čemer pa ima vsak svoje prednosti in pomanjkljivosti. Premišljena izbira obeh vrst markerjev lahko zato predstavlja neprecenljivo orodje za odkrivanje raznolikosti in za upravljanje z genskimi viri oljke v kolekcijskih nasadih, genskih bankah in drevesnicah.

Sedem novih markerjev EST-SSR smo uporabili tudi v starševskem testu 'Itrske belice'. Zaključimo lahko, da so genski mikrosateliti primerno orodje za ugotavljanje starševstva,

saj smo z njimi določili potencialne donorje peloda ‘Istrske belice’ in ugotovili, da je ‘Istrska belica’ delno samonekompatibilna. Dobljeni rezultati predstavljajo pomembno izhodišče za načrtovanje obsežnejših, večletnih poskusov za določanje optimalnih opraševalnih sort in stopnje samo(ne)kompatibilnosti ‘Istrske belice’ in drugih oljčnih sort. Rezultati prav tako nakazujejo, da bi bilo v nadaljnje raziskave smiselno vključiti dodatne metode, kot so denimo spremljanje kaljivosti peloda, kontrolirano opraševanje in proučevanje receptivnosti brazde pestiča, rasti pelodnega mešička ter viabilnosti semenskih zasnov. Poznavanje opraševalnih odnosov vodilnih oljčnih sort je izrednega pomena pri pripravi novih ali sanaciji slabo rodnih nasadov, saj lahko le premišljena sortna sestava vodi do višjih in rednih pridelkov brez uporabe drugih agrotehničnih ukrepov.

## 7 POVZETEK (SUMMARY)

### 7.1 POVZETEK

Gojena oljka (*Olea europaea* L.) je dolgoživo, zimzeleno drevo in se jo goji za pridobivanje olja. Pridelava oljk je osrednja kmetijska panoga na območju sredozemskega bazena, kjer se pridela skoraj 98 % svetovne proizvodnje oljke. V Sloveniji je oljka druga najbolj razširjena sadna vrsta takoj za jablano in na 2068 ha se letno proizvede med 500 in 700 ton oljčnega olja. Slovensko oljkarstvo je zaznamovano s posebnimi geografskimi razmerami in edinstveno sortno strukturo, ki se je izoblikovala v več stoletjih gojenja in je posledica različnih poskusov revitalizacije oljkarstva na tem območju. V slovenskih oljčnikih je najbolj zastopana sorta 'Istarska belica', ki predstavlja kar 65 % vseh oljčnih dreves in se jo je intenzivno razmnoževalo v 20. stoletju, saj je odlično prilagojena lokalnim in regionalnim razmeram.

Oljčno olje je funkcionalno živilo, ker vsebuje biološko aktivne molekule, ki prispevajo k njegovim terapevtskim učinkom. Poznavanje genov, ki so odgovorni za sintezo teh bioloških molekul, je izjemno pomembno za izboljšanje kakovosti oljčnega olja in za razvoj novih sort. V zadnjem času so bile za številne kmetijske rastline izdelane obsežne podatkovne baze EST, ki so omogočile identifikacijo in razvoj mnogih funkcijskih molekulskih markerjev, povezanih z geni oz. s proučevanimi lastnostmi. Omejene informacije o agronomsko pomembnih lastnostih zavirajo napredek na področju žlahtniteljskih programov oljke in spodbujajo razvoj markerjev, ki so povezani s tovrstnimi lastnostmi.

Dolgoživost oljčnih dreves, kompatibilnost in križanje med divjimi, podivjanimi in gojenimi oblikami ter fiksacija želenih lastnosti genotipov oljk s pomočjo vegetativnega razmnoževanja so priveli do izjemne genetske raznolikosti oljčnih sort. Sistematsko vrednotenje slovenskih genskih virov oljke se je pričelo v letu 1990 in je služilo kot izhodišče za vzpostavitev dveh nacionalnih kolekcijskih nasadov, Strunjan in Purissima (Ankaran). Karakterizacija in vrednotenje genskih virov oljke na nivoju DNA sta ključnega pomena za ohranjanje genskih virov oljke, za nadaljnje žlahtniteljske programe oljke in za čim bolj optimalno upravljanje z genskim bazenom oljke v Sloveniji.

Čeprav je oljka vetrocvetna rastlina s hermafroditskimi cvetovi, je večina sort samoneoplodnih, kar pomeni, da potrebujejo za uspešno oploditev in razvoj plodov kompatibilno opaševalno sorto. S premišljenim izborom sort in njihovih najprimernejših opaševalnih sort lahko vplivamo na uspešnost oploditve in pridelek ter posledično na rodnost oljčnega nasada, kar je ključnega pomena za uspešno in ekonomično pridelavo. Številne študije, v katerih so proučevali kompatibilnost oljčnih sort, so privede do spremenljivih in nasprotujučih si rezultatov. Tradicionalne raziskovalne pristope za

ugotavljanje kompatibilnosti oljčnih sort je zato nadomestila metoda starševskega testa z mikrosatelitskimi markerji, kar omogoča proučevanje gibanja peloda z zračnimi tokovi in proučevanje spolne kompatibilnosti pri rastlinah.

Osrednji namen raziskave je bilo povečati število potrjenih markerjev EST-SSR, ki bodo v korist oljčni raziskovalni skupnosti. Zato smo si v okviru doktorske naloge zadali naslednje cilje: (1) identificirati in karakterizirati ponavljajoča se zaporedja v transkriptomu oljke, (2) razviti in potrditi nov set markerjev EST-SSR pri oljki, (3) ovrednotiti uporabnost markerjev EST-SSR pri genetskih študijah oljke in pri upravljanju nacionalnih kolekcijskih nasadov oljke, v primerjavi s predhodno objavljenimi genomskega mikrosateliti, (4) določiti najpogosteje oprševalne sorte 'Istrske belice' z izvedbo starševskega testa z mikrosatelitskimi markerji in oceniti stopnjo samooplodnosti te sorte.

Za razvoj novih markerjev EST-SSR smo uporabili transkriptom razvijajočega plodu oljke sorte 'Itrska belica', ki je bil razvit s pomočjo metodologije pirosekenciranja 454 (SRX215662, 2012; Rešetič in sod., 2013). Za identifikacijo mikrosatelitov smo uporabili program MISA in z njim pregledali 98.924 zaporedij EST. Mikrosatelite smo odkrili v 923 zaporedijih EST, in sicer skupno 984 mikrosatelitov. V analiziranih zaporedijih EST oljke se je na 37,4 kb nahajal povprečno en lokus EST-SSR. V naši raziskavi je približno 1 % zaporedij EST oljke vseboval mikrosatelite. Največ je bilo dinukleotidnih mikrosatelitskih motivov (35,6 %) in sledili so jim trinukleotidni motivi (32,5 %). Med dinukleotidnimi markerji SSR je bil najbolj pogost motiv GA/TC (36,9 %) in med trinukleotidi motiv GAA/TTC (15,6 %). Po končani anotaciji in dodelitvi domnevnih funkcij zaporedjem EST-SSR oljke smo za 110 lokusov uspešno izdelali pare začetnih oligonukleotidov. Po končani optimizaciji protokola pomnoževanja (PCR) na skupini osmih oljčnih sort smo v primeru 46 (41,8 %) razvitih začetnih oligonukleotidov uspeli pridobiti kakovostne amplikone. S sekvenčno reakcijo in poravnavo alelov EST-SSR oljke smo potrdili pomnoževanje predvidenih mikrosatelitskih motivov za vseh 46 markerjev EST-SSR ter odkrili visoko stopnjo ohranjenosti robnih območij analiziranih mikrosatelitskih lokusov.

S pomočjo orodja Blast2GO smo vsem 923 zaporedjem EST, ki so vključevala mikrosatelit, pripisali znane proteinske produkte. Med njimi je bilo 246 zaporedij EST homolognih z znanimi proteini, na podlagi katerih smo zaporedjem pripisali GO kategorije. Na novo razviti markerji EST-SSR so bili v glavnem v povezavi s procesi biosinteze lipidov (OeUP-16), z razvojem embrijev (OeUP-09 in OeUP-17) ter s celičnim odgovorom na stres (OeUP-23 in OeUP-25), medtem ko drugim markerjem nismo uspeli pripisati GO kategorije. Preostalih 138 zaporedij (14,9 %) je bilo homolognih z izraženimi hipotetičnimi/neznanimi/neimenovanimi proteini in 538 (58,3 %) zaporedij EST, ki so vsebovala mikrosatelit, ni imelo nobenega proteinskega zadetka. Pri pregledovanju položaja 46 markerjev EST-SSR je bilo 65,2 % naših zaporedij EST-SSR pozicioniranih v

nekodirajočih regijah (UTR) in le 34,8 % zaporedij EST-SSR se je nahajalo v kodirajočih regijah (CDS). Analiza mikrosatelitskih motivov v regijah UTR pri oljki je pokazala, da so prevladovali trinukleotidi (34,8 %) in sledili so dinukleotidi (23,9 %). V kodirajočih regijah (CDS) oljke so prevladovali trinukleotidi (32,6 %).

Vseh 46 novih markerjev EST-SSR in 15 predhodno objavljenih genskih mikrosatelitskih lokusov oljke smo testirali glede njihove uporabnosti pri proučevanju raznolikosti 24 oljčnih sort. Celokupno DNA smo izolirali iz oljčnih listov s pomočjo protokola CTAB. Po optimizaciji verižne reakcije s polimerazo (PCR) smo pomnožene mikrosatelite ločili s pomočjo kapilarnega sekvenatorja. Vseh 46 lokusov EST-SSR in 15 genomskeh mikrosatelitskih markerjev se je izkazalo kot polimorfnih. Pri markerjih EST-SSR je bilo povprečno število alelov na lokus 4,5 in pri genomskeh markerjih SSR 6,8. Povprečni vrednosti dejanske ( $H_o$ ) in pričakovane ( $H_e$ ) heterozigotnosti sta pri markerjih EST-SSR znašali 0,649 oz. 0,604. Nekoliko višje vrednosti ( $H_o=0,854$ ,  $H_e=0,729$ ) smo ugotovili pri genomskeh markerjih SSR. Nizke skupne vrednosti PI in visoki povprečni vrednosti PIC markerjev EST-SSR in genomskeh mikrosatelitskih markerjev potrjujejo, da sta oba markerska sistema primerna za razlikovanje analiziranih oljčnih sort. Kar 30 na novo razvitih markerjev EST-SSR se je uvrstilo med informativne markerje (PIC>0,5) in 9 med markerje, primerne za gensko kartiranje (PIC>0,7). Na splošno je med temi 30 markerji 27 takih (OeUP-01, OeUP-02, OeUP-04, OeUP-05, OeUP-06, OeUP-08, OeUP-09, OeUP-11, OeUP-13, OeUP-14, OeUP-16, OeUP-18, OeUP-19, OeUP-20, OeUP-21, OeUP-22, OeUP-24, OeUP-26, OeUP-29, OeUP-30, OeUP-32, OeUP-34, OeUP-37, OeUP-39, OeUP-40, OeUP-42, OeUP-45), ki so še posebej priporočljivi, saj jih odlikuje nizka frekvenca ničnih alelov in ni zabeleženih odstopanj od Hardy-Weinbergovega ravnovesja.

Genske in genomske mikrosatelite smo uporabili za proučevanju sorodnostnih odnosov med analiziranimi oljčnimi sortami in za upravljanje dednine oljke v slovenskih kolekcijskih nasadih oljke. Za izračun genetskih razdalj med 24 oljčnimi sortami smo uporabili Jaccardove koeficiente podobnosti. Na podlagi rezultatov genotipizacije z markerji EST-SSR in genomske mikrosateliti smo iz matrike podobnosti in s pomočjo metode UPGMA izdelali dva ločena dendrograma. Razporeditev oljčnih sort v sorodnostne skupine je bila v primeru obeh markerskih sistemov podobna. Za vse toskanske sorte, ki so namenjene pridobivanju oljčnega olja, smo potrdili skupno genetsko ozadje. Analiza razvrščanja v sorodnostne skupine z novimi genskimi markerji je potrdila, da sta slovenski sorte ‘Zelenjak’ in ‘Črnica’ zelo sorodni s toskanskimi sortami, kar je bilo ugotovljeno že v predhodnih raziskavah (Bandelj in sod., 2004). Za najbolj zastopano lokalno sorto ‘Itrska belica’ se je, tako z genomske kot z genske mikrosatelitske markerji, izkazalo, da kaže izjemno nizko genetsko sorodnost z drugimi oljčnimi sortami. Ti rezultati so potrdili, da so tudi genski mikrosateliti primerni in uporabni za proučevanje sorodnostnih odnosov pri oljki. Genetska raznolikost znova sort ‘Ascolana tenera’ in ‘Santa Caterina’ se je jasno pokazala le z genomske mikrosateliti. To je najverjetnejše posledica dejstva, da genomski

in genski markerji SSR pokrivajo različne regije genoma oljke, kar vodi do različnih perspektiv genetske raznolikosti (Varshney in sod., 2005b). Med 46 markerji EST-SSR in 15 genomske lokusi SSR smo za 11 (24 %) oz. 4 (27 %) lokuse določili statistično značilno odstopanje od Hardy-Weinbergovega ravnovesja. V naši raziskavi je bila večina odstopanj posledica ene vrste in redkeje dveh vrst homozigotov na analiziranih lokusih ter ene kombinacije identičnih alelov, opažene pri večini oljčnih sort. Pri šestih lokusih EST-SSR (13 %) in enem lokusu SSR (7 %) so bile vrednosti frekvenc ničtih alelov višje od 0,2, ki označuje zgornjo mejo, pod katero naj bi bil pojav mikrosatelitskih ničtih alelov neobičajen oz. redek. Dobro sposobnost razlikovanja genskih in genomskeh markerjev smo določili z izračunom minimalnega števila markerjev, ki so potrebni za razlikovanje vseh ugotovljenih genotipov. Izkazalo se je, da že dva lokusa EST-SSR (OeUP-04 in OeUP-14) zadoščata za nedvoumno razlikovanje vseh 24 genotipov v našem vzorcu. Za razlikovanje vseh 27 genotipov z genomske markerji SSR so bili potrebni trije lokusi SSR (DCA9, DCA16, DCA18).

Za 'Istrsko belico' je splošno razširjeno dejstvo, da je samooplodna, a pridelovalci opozarjajo, da se pri tej sorti na določenih lokacijah pojavljajo težave z rodnostjo. Plodove za izolacijo DNA iz oljčnih embrijev smo nabrali v enosortnem nasadu 'Itrske belice' (Osp) in v nacionalnem kolekcijskem oljčnem nasadu (Strunjan), v letu 2012 in 2013. Za izolacijo DNA iz oljčnih embrijev smo uporabili metodo, ki sta jo objavila Guerin in Sedgley (2007), z manjšimi spremembami. Za genotipizacijo oljčnih embrijev in vseh potencialnih opraševalnih oljčnih sort smo uporabili 7 visoko polimorfnih markerjev EST-SSR. Visoka kumulativna vrednost parametra verjetnosti izključitve (EP) in zelo nizke vrednosti parametra verjetnosti enakosti genotipov (PI) so potrdile primernost izbranega seta markerjev za izdelavo starševskega testa. Starševski test smo izdelali s tremi različnimi računalniškimi programi: FAMOZ (Gerber in sod., 2003), CERVUS (Kalinowski in sod., 2007) in PARENTE (Cercueil in sod., 2002). Sorte, ki smo jih določili kot najverjetnejše opraševalne sorte 'Itrske belice', se med uporabljenimi računalniškimi programi niso bistveno razlikovale. Identificirane potencialne opraševalne sorte so se nekoliko razlikovale med oljčnima nasadoma in med rastnima sezonomama, kar je lahko posledica različnega nabora sort v neposredni bližini analiziranih dreves in različnih mikroklimatskih pogojev. V naši analizi se je najbolje izkazal program FAMOZ, saj smo le z njim odkrili štiri primere samooplodnje pri 'Istrski belici'. Za določitev stopnje samo(ne)oplodnosti 'Itrske belice' smo leta 2013 v Ospu in Strunjanu primerjali število razvitih plodov v primeru samooprašitve in naravne opašitve. Pri naravnem opaševanju je bil odstotek razvitih plodov večji v primerjavi s samooprašitvijo znotraj bombažnih vrečk. Vrednosti indeksa samonekompatibilnosti sta bili na obeh lokacijah med 0,2 in 1,0 zato se je sorta 'Itrska belica' izkazala kot delno samonekompatibilna. Tudi rezultati genotipizacije embrijev z markerji EST-SSR, ki so se razvili znotraj opaševalnih vrečk, so pokazali, da vsi embriji niso bili samooplojeni. S tem smo dodatno potrdili nizko stopnjo samooplodnosti te sorte.

Zaključimo lahko, da smo uspešno razvili 46 novih markerjev EST-SSR, ki so glede sposobnosti odkrivanja raznolikosti primerljivi z genomske mikrosateliti. Na novo razvite markerje EST-SSR smo uspešno uporabili za (1) analizo genetske raznolikosti 24 oljčnih sort, (2) za oceno genetske sorodnosti med oljčnimi sortami, (3) za potrditev pravilnosti opisa sadilnih mest v nacionalnih kolekcijskih nasadih oljk in (4) za izdelavo starševskega testa. Rezultati starševskega testa so pokazali, da je za 'Itrska belica' značilna navzkrižna kompatibilnost z različnimi oljčnimi sortami in nizka stopnja samokompatibilnosti. To nakazuje, da bo za pridelovalce potrebno izdelati nove smernice za gojenje 'Itrske belice'. Set novih genskih markerjev se bo lahko uporabilo za širok spekter raziskav s področja genetike in žlahtnjenja oljke, kamor sodijo ocena genetske raznovrstnosti, selekcija s pomočjo markerjev, izdelava vezanih genskih kart in tudi primerjalna genomika, saj so markerji EST-SSR prenosljivi med sorodnimi vrstami.

## 7.2 SUMMARY

The cultivated olive (*Olea europaea* L.) is a long-living evergreen oil fruit tree. Its production is the most important branch of agriculture in the Mediterranean basin, which provides about 98% of world olive production. In Slovenia, olive is the second most widespread fruit species after the apple, and, at present, between 500 and 700 tons of olive oil is produced annually on some 2,068 hectares of land. Slovenian olive growing is characterized by particular geographic conditions and a unique variety structure, which has been shaped over centuries and is a result of various attempts to revitalize olive growing in the region. The leading variety in Slovenian olive orchards is 'Itrska belica', which represents 65% of olive trees and was intensively propagated in the 20th century, owing to its effective adaptation to local, regional conditions.

Olive oil is considered to be a functional food, with varied biologically active components that contribute to its overall therapeutic characteristics. Consequently, an investigation of the genes responsible for the synthesis of these bio-molecules is essential for the improvement of olive oil quality and the development of new varieties. Recently, a vast array of EST datasets has been generated for many crop plants, which has presented the opportunity to identify and develop numerous functional molecular markers linked to the genes or traits of interest. The limited information on the inheritance of agronomically significant traits retards progress in olive breeding programs and encourages the development of markers linked to the traits.

The longevity of olive trees, compatibility and crossing between wild, feral, and cultivated forms, and fixation of desirable olive genotypes through vegetative propagation have led to wide genetic diversity among olive varieties. Evaluation of Slovenian genetic resources has been systematically conducted since 1990 and has served as the starting point for the

establishment of two national olive collections: Strunjan and Purissima (Ankaran). Characterization and evaluation of olive genetic resources at the DNA level is essential for the preservation of olive genetic resources, for further olive breeding programs, and for optimizing a strategy for the management of the Slovenian olive gene pool.

Although the olive flowers are hermaphroditic and wind pollinated, most varieties are self-incompatible and need pollinators for successful fertilization and fruit production. The choice of varieties and their pollinators thus determines the fertility, fruit set, and consequently the productivity of olive orchards, which are all important factors for successful, cost effective production. Several studies on the identification of compatible cultivars have resulted in variable and contrasting results. Traditional approaches for studying the compatibility of olive varieties have been replaced by paternity analysis based on SSRs, which is an essential method for pollen flow studies and for studying the sexual compatibility of plants.

The main purpose of this study was to increase the number of validated EST-SSR markers, for the benefit of the olive research community. Therefore, the following objectives were assigned within the framework of the doctoral thesis: (1) to identify and characterize repetitive sequences in olive transcriptome shotgun assembly; (2) to develop and validate the new set of EST-SSR markers for olive; (3) to evaluate the utility of EST-SSRs in olive genetic studies and to assess the utility of these markers for the management of the national olive collections, all in comparison to previously reported genomic SSRs; (4) to identify pollen donors for the olive variety 'Itrska belica' by paternity analysis using EST-SSRs and to assess the proportion of self-fertilization.

For the development of EST-SSR markers, the olive transcriptome from developing fruits of the 'Itrska belica' variety generated by the 454 pyrosequencing methodology (SRX215662, 2012; Rešetič et al., 2013) was used. For SSRs identification, a total of 98,924 EST sequences was examined with the MISA tool. A total of 984 SSR loci were identified in 923 SSR-containing ESTs with a frequency of one EST-SSR locus per 37.4 kb. Approximately 1.0% of olive EST sequences contained microsatellites. Dinucleotide repeats were the most frequent (35.6%), followed by trinucleotides (32.5%). The most abundant dinucleotide SSR motif (36.9%) was GA/TC, while the motif GAA/TTC was the most common among trinucleotide SSRs (15.6%). After the annotation and assignment of putative functions to olive EST-SSR sequences, primers were successfully designed for 110 loci. After optimization of the PCR protocol in a set of eight olive varieties, quality amplicons were obtained for 46 (41.8%) developed primers. The sequencing and alignment of the olive EST-SSR alleles confirmed the amplification of predicted microsatellite motifs for all forty-six EST-SSRs and revealed a high degree of conservation of the SSRs flanking regions.

Alignment and functional annotation of all 923 EST sequences containing microsatellite were performed using the Blast2GO tool. A total of 246 EST sequences had homology with known proteins and were further annotated against the GO database. Ten newly developed EST-SSR markers were associated with the lipid biosynthetic process (OeUP-16), embryo development (OeUP-09 and OeUP-17), and cellular response to stress (OeUP-23 and OeUP-25), while no GO terms were determined for other markers. However, other sequences (138, 14.9%) were homologous to expressed, hypothetical/unknown/unnamed proteins, while 538 (58.3%) SSR-containing sequences showed no significant hits. When reviewing the location of 46 EST-SSRs, 65.2% EST-SSR sequences were positioned in untranslated regions (UTRs), and only 34.8% were located in the coding regions (CDSs). The analysis of motifs of microsatellites in olive UTRs demonstrated that trinucleotides and dinucleotides occurred in 34.8% and 23.9%, respectively. In CDSs, trinucleotide motifs were predominant (32.6%).

All 46 newly developed EST-SSRs and 15 previously reported genomic SSRs were used for testing their applicability in a diversity study in a set of twenty-four olive varieties. Total DNA was extracted from leaf tissue using the CTAB method. After the optimization of PCR, amplified microsatellites were separated by a capillary genetic analyzer. All 46 EST-SSRs loci and 15 genomic SSRs were polymorphic, with an average number of 4.5 and 6.8 alleles per locus, respectively. The average observed ( $H_o$ ) and expected ( $H_e$ ) heterozygosity for EST-SSRs were 0.649 and 0.604, respectively. Slightly higher results ( $H_o=0.854$ ,  $H_e=0.729$ ) were obtained with genomic SSRs. Low common PI values and high average PIC values for EST-SSRs and genomic SSRs confirmed the comparable ability of both marker systems in the detection of olive genetic diversity. Furthermore, 30 newly developed EST-SSR markers were classified as informative markers (PIC>0.5) and nine as suitable markers for gene mapping (PIC>0.7). Overall, among these thirty markers, 27 (OeUP-01, OeUP-02, OeUP-04, OeUP-05, OeUP-06, OeUP-08, OeUP-09, OeUP-11, OeUP-13, OeUP-14, OeUP-16, OeUP-18, OeUP-19, OeUP-20, OeUP-21, OeUP-22, OeUP-24, OeUP-26, OeUP-29, OeUP-30, OeUP-32, OeUP-34, OeUP-37, OeUP-39, OeUP-40, OeUP-42, OeUP-45) are strongly recommended, given the low frequency of null alleles and no observed deviation from Hardy-Weinberg equilibrium.

Genic and genomic SSRs were also used to assess the genetic relationship among these olive varieties, and to manage the olive germplasm in the Slovenian olive collections. Jaccard's similarity coefficient was used for calculating the genetic distances among pairwise combinations in a set of twenty-four olive varieties. Dendograms based on the EST-SSR and SSR data were separately constructed from the matrix of similarity, using the UPGMA method, and revealed a similar distribution of olive varieties into related groups. Common genetic background was confirmed for all Tuscan olive varieties for oil use. Clustering analysis with new genic markers confirmed that the Slovenian varieties 'Zelenjak' and 'Črnica' are closely related to Tuscan olives, as has been previously noted

(Bandelj et al., 2004). Both genomic and EST-SSR markers also demonstrated that the predominant local variety ‘Itrska belica’ showed a very low level of genetic similarity with other varieties. These results confirmed the equal ability and functionality of the use of genic SSRs for genetic relationship studies in olive. The genetic diversity within the varieties ‘Ascolana tenera’ and ‘Santa Caterina’ was effectively resolved only by genomic SSRs, probably because of the differences in target DNA regions or genomic coverage rate of the analysed marker systems (Varshney et al., 2005b). Out of forty-six EST-SSR loci and fifteen SSR loci, eleven (24%) and four (27%) loci demonstrated deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium, respectively. Most deviations can be assigned to the excess of one class and more rarely two classes of homozygotes on the analysed loci and to an excess of one combination of identical alleles observed in a larger set of olive varieties. At six EST-SSR loci and on one SSR locus, the estimated frequencies of null alleles were higher than 0.2, indicating the upper boundary under which the microsatellite null alleles are uncommon to rare (Dakin and Avise, 2004). Good discrimination power of the new genic and genomic markers was demonstrated with the selection of the minimum number of markers needed to distinguish all identified olive genotypes. Two EST-SSR loci (OeUP-04 and OeUP-14) were determined to be sufficient for the unambiguous discrimination of 24 olive varieties, while three SSR loci (DCA9, DCA16 and DCA18) were necessary to distinguish 27 identified olive genotypes.

‘Itrska belica’ is traditionally believed to be self-compatible, although growers have noted that there are some existing problems with fruit set and fertility in some growing locations. In this study, sampling of olive fruit was performed in a monovarietal olive orchard (Osp) and in the national olive collection (Strunjan), in the growing seasons 2012 and 2013. DNA was extracted from olive embryos by a modified method (Guerin and Sedgley, 2007), and seven new EST-SSR loci with high polymorphic information content were used for genotyping olive embryos and all potential pollen donor varieties. In the parental population, high values of cumulative exclusion probability and very low values of probability of identity confirmed the suitability of the selected ETS-SSRs for paternity analysis. Paternity analysis was performed using three different types of software: FAMOZ (Gerber et al., 2003), CERVUS (Kalinowski et al., 2007) and PARENTE (Cercueil et al., 2002). Our results showed that all three software types were able to identify similar potential fathers for the ‘Itrska belica’ variety. Potential pollen donors identified differed slightly between orchards and between growing seasons, owing to the different olive varieties in the immediate vicinity of the experimental field and to various microclimatic conditions. In this study, FAMOZ performed best, since only this software confirmed self-fertilization for 4 analyzed embryos. In order to determine the level of self(in)-compatibility of ‘Itrska belica’, final fruit set in self-pollination versus free pollination were compared during the 2013 flowering season in Osp and Strunjan. Free pollination in ‘Itrska belica’ improved final fruit set when compared with self-pollination in cotton bags. In both experimental orchards, the calculated index of self-incompatibility

was between 0.2 and 1.0 and classified the ‘Istrska belica’ variety as partly self-incompatible. Furthermore, genotyping analysis of embryos developed within the pollination bags showed that some of these embryos were not fertilized with ‘Istrska belica’ pollen and confirmed the very low rate of self-fertility in this variety.

In conclusion, we have developed a novel set of 46 EST-SSR markers, which possess diversity properties comparable to genomic SSRs. Newly developed EST-SSRs were successfully used (1) for genetic diversity analysis of twenty-four olive varieties, (2) to assess genetic relationships among olive varieties, (3) to verify the correct description of planting sites in national olive collections, and (4) for paternity analysis. The paternity testing showed that ‘Istrska belica’ is cross-compatible with other olive varieties, and, that the absence of self-fertility requires novel growing guidelines for growers. The new set of functional markers could be used for a wide range of olive genetic and breeding applications, including genetic diversity assessment, marker-assisted selection, the construction of linkage maps, and for comparative genomics, based on their possible transferability to the related species.

## 8 VIRI

- Abdessemed S., Muzzalupo I., Benbouza H. 2015. Assessment of genetic diversity among Algerian olive (*Olea europaea* L.) cultivars using SSR marker. *Science of Horticulture*, 192: 10–20
- Adal A.M., Demissie Z.A., Mahmoud S.S. 2015. Identification, validation and cross-species transferability of novel *Lavandula* EST-SSRs. *Planta*, 241: 987–1004
- Adamič F. 1998. Stanje in razvoj južnih kultur in oljkarstva v slovenski Istri. Pregled raziskav oljke in oljčnega olja v obdobju 1945–1995. V: Glasnik ZRS Koper, Darovec D. (ur.). Koper, Znanstveno-raziskovalno središče Republike Slovenije Koper, 3, 5: 22–26
- Adams M.D., Kelley J.M., Gocayne J.D., Dubnick M., Polymeropoulos M.H., Xiao H., Merril C.R., Wu A., Olde B., Moreno R.F. in sod. 1991. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science*, 252: 1651–1656
- Adawy S.S., Mokhtar M.M., Alsamman A.M., Sakr M.M. 2013. Development of Annotated EST-SSR Database in Olive (*Olea europaea*). *Internation Journal of Science and Research*, 4, 9: 1063–1073
- Al-Kasabeh M.F., Ateyyeh A.F., Qrunfleh M.M. 2005. A Study on Self- and Cross-pollination of Three Olive Cultivars in Jordan. *Dirasat Agricultural Sciences*, 32, 2: 222–228
- Alagna F., D'Agostino N., Torchia L., Servili M., Rao R., Pietrella M., Giuliano G., Luisa Chiusana M., Baldoni L., Perrotta G. 2009. Comparative 454 pyrosequencing of transcripts from two olive genotypes during fruit development. *BMC Genomics*, 10, doi: 10.1186/1471-2164-10-399: 15 str.
- Alagna F., Mariotti R., Panara F., Caporali S., Urbani S., Veneziani G., Esposto S., Taticchi A., Rosati A., Rao R., Perrotta G., Servili M., Baldoni L. 2012. Olive phenolic compounds: metabolic and transcriptional profiling during fruit development. *BMC Plant Biology*, 12: 162–183
- Alagna F., Cirilli M., Galla G., Carbone F., Daddiego L. Paolo Facella, Lopez L., Colao C., Mariotti R., Cultrera N., Rossi M., Barcaccia G., Baldoni L., Muleo R., Perrotta G. 2016. Transcript analysis and regulative events during flower development in olive (*Olea europaea* L.). *PLoS ONE*, 11, 4: e0152943, doi: 10.1371/journal.pone.0152943: 32 str.
- Alba V., Sabetta W., Blanco A., Pasqualone A., Montemurro C. 2009. Microsatellite markers to identify specific alleles in DNA extracted from monovarietal virgin olive oils. *European Food Research and Technology*, 229: 375–382
- Ali Hashmi M., Khan A., Hanif M., Fatooq U., Perveen S. 2015. Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology of *Olea europaea* (Olive). *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2015: 541591, doi: 10.1155/2015/541591: 29 str.

- Andersen J.R., Lübbestedt T. 2003. Functional markers in plants. Trends in Plant Science, 8: 554–560
- Angiolillo A., Mencuccini M., Baldoni L. 1999. Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. Theoretical and Applied Genetics, 98: 411–421
- ARSO (Agencija RS za okolje). 2012. Razvoj suše v Sloveniji v letu 2012  
<http://www.arso.gov.si/vode/poro%C4%8Dila%20in%20publikacije/Susa%20v%20SloveSlov%202012.pdf> (avgust, 2016)
- Ateyyeh A.F., Stosser R., Qrunfleh M. 2000. Reproductive biology of the olive (*Olea europaea* L.) cultivar ‘NabaliBaladi’. Journal of Applied Botany-Angewandte Botanik, 74: 255–270
- Ayerza R., Coates W. 2004. Supplemental pollination - Increasing olive (*Olea europaea*) yields in hot, arid environments. Experimental Agriculture, 40: 481–491
- Bainbridge M.N., Warren R.L., Hirst M., Romanuk T., Zeng .T, Go A., Delaney A., Griffith M., Hickenbotham M., Magrini V., Mardis E.R., Sadar M.D., Siddiqui A.S., Marra M.A., Jones S.J. 2006. Analysis of the prostate cancer cell line LNCaP transcriptome using a sequencing-by-synthesis approach. BMC Genomics, 7, doi: 10.1186/1471-2164-7-246: 11 str.
- Baldoni L., Tosti N., Ricciolini C., Belaj A., Arcioni S., Pannelli G., Germana M.A., Mulas M., Porceddu A. 2006. Genetic structure of wild and cultivated olives in the central Mediterranean basin. Annals of Botany, 98: 935–942
- Baldoni L., Cultrera N.G., Mariotti R., Ricciolini C., Arcioni S., Vendramin G.G., Buonamici A., Porceddu A., Sarri V., Ojeda M.A., Trujillo I., Rallo L., Belaj A., Perri E., Salimonti A., Muzzalupo I., Casagrande A., Lain O., Messina R., Testolin R. 2009. A consensus list of microsatellites 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, 3: 185–190
- Bandelj Mavsar D., Jakše J., Javornik B. 2004. Assessment of genetic variability of olive varieties by microsatellite and AFLP markers. Euphytica, 136: 93–102
- Bandelj D., Bučar-Miklavčič M., Lipnik A., Maršič K., Matekovič P., Režek-Donev N., Škerlič I. 2006. Izdelava predhodne študije ekstra deviškega oljčnega olja z geografskim poreklom. Koper, Znanstveno-raziskovalno središče Koper: 48 str.
- Bandelj D., Javornik B. 2007. Microsatellites as a powerful tool for identification of olive (*Olea europaea* L.) planting material nurseries. Annales, Series historia naturalis, 17, 1: 133–138
- Banilas G., Moressis A., Nikoloudakis N., Hatzopoulos P. 2005. Spatial and temporal expressions of two distinct oleate desaturases from olive (*Olea europaea* L.). Plant Sciences, 168: 547–555

- Banilas G., Nikiforidis A., Makariti I., Moressis A., Hatzopoulos P. 2007. Discrete roles of a microsomal linoleate desaturase gene in olive identified by spatiotemporal transcriptional analysis. *Tree Physiology*, 27: 481–490
- Banilas G., Karampelas M., Makariti I., Kourtzi A., Hatzopoulos P. 2011. The olive DGAT2 gene is developmentally regulated and shares overlapping but distinct expression patterns with DGAT1. *Journal of Experimental Botany*, 62: 521–532
- Banilas G., Hatzopoulos P. 2013. Genetics and Molecular Biology of Olives. V: Handbook of Olive Oil. Aparicio R., Harwood J. (eds.), New York, Springer: 129–161
- Bao J., Corke H., Sun M. 2002. Microsatellites in starch-synthesizing genes in relation to starch physicochemical properties in waxy rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 105: 898–905
- Bao J., Corke H., Sun M. 2006. Microsatellites, single nucleotide polymorphisms and a sequence tagged site in starch-synthesizing genes in relation to starch physicochemical properties in nonwaxy rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 113: 1185–1196
- Barghini E., Natali L., Cossu R.M., Giordani T., Pindo M., Cattonaro F., Cavallini A. 2014. The peculiar landscape of repetitive sequences in the olive (*Olea europaea* L.) genome. *Genome Biology and Evolution*, 6, 4: 76–791
- Barranco D., Cimato A., Fiorino P., Rallo L., Touzani A., Castañeda C., Serafini F., Trujillo I. 2000. World Catalogue of Olive Varieties, International Olive Oil Council (IOOC), Madrid, Spain
- Bartolini G. 2008. Olive germplasm (*Olea europaea* L.)  
<http://www.oleadb.it/olivodb.html> (november 2013)
- Baruca Arbeiter A., Hladnik M., Jakše J., Bandelj D. 2017. Identification and validation of novel EST-SSR markers in olive. *Scientia Agricola*, 74, 3, doi: 10.1590/1678-992X-2016-0111: 11 str.
- Baruca Arbeiter A., Jakše J., Bandelj D. 2014. Paternity Analysis of the Olive Variety ‘Istrska Belica’ and Identification of Pollen Donors by Microsatellite Markers. *Scientific World Journal*, 2014, 208590, doi: 10.1155/2014/208590: 6 str.
- Bazakos C., Manioudaki M.E., Therios I., Voyatzis D., Kafetzopoulos D., Awada T., Kalaitzis P. 2012. Comparative Transcriptome Analysis of Two Olive Cultivars in Response to NaCl-Stress. *PLoS ONE*, 7, 8: e42931, doi: 10.1371/journal.pone.0042931: 15 str.
- Bazakos C., Manioudaki M.E., Sarropoulou E., Spano T., Kalaitzis P. 2015. 454 Pyrosequencing of Olive (*Olea europaea* L.) Transcriptome in Response to Salinity. *PLoS ONE*, 10, 11: e0143000, doi: 10.1371/journal.pone.0143000: 22 str.
- Belaj A., Trujillo I., de la Rosa R., Rallo L., Gimenez M.J. 2001. Polymorphism and discrimination capacity of randomly amplified polymorphic markers in an olive germplasm bank. *Journal of the American Society Horticultural Science*, 126: 64–71

- Belaj A., Cipriani G., Testolin R., Rallo L., Trujillo I. 2004. Characterization and identification of the main Spanish and Italian olive cultivars by simple-sequence-repeat markers. Horticultural Science, 39: 1557–1561
- Belaj A., Muñoz-Diez C., Baldoni L., Porceddu A., Barranco D., Satovic Z. 2007. Genetic diversity and population structure of wild olives from the North-western Mediterranean assessed by SSR markers. Annals of Botany, 100: 449–458
- Belaj A., Dominguez-García M.C., Atienza S.G., Urdíroz N.M., De la Rosa R., Satovic Z., Martín A., Kilian A., Trujillo I., Valpuesta V., Del Río C. 2012. Developing a core collection of olive (*Olea europaea* L.) based on molecular markers (DArTs, SSRs, SNPs) and agronomic traits. Tree Genetics & Genomes, 8: 365–378
- Belaj A., Veral M.G., Siakoui H., Moukhli A., Khadari B., Mariotti R., Baldoni L. 2016. Olive Genetic Resources. V: The Olive Tree Genome. Rugini E., Baldoni L., Muleo R., Sebastiani L. (eds.). Switzerland, Springer International Publishing: 27–54
- Ben-Ayed R., Grati-Kamoun N., Sans-Grout C., Moreau F., Rebai A. 2012. Characterization and authenticity of virgin olive oil (*Olea europaea* L.) cultivars by microsatellite markers. European Food Research and Technology, 234: 263–271
- Ben Ayed R., Ben Hassen H., Ennouri K., Ben Marzoug R., Rebai A. 2016. OGD (*Olive Genetic Diversity Database*): a microsatellite markers genotypes database of worldwide olive trees for cultivar identification and virgin olive oil traceability. Database, 2016, doi: 10.1093/database/bav090: 9 str.
- Besnard G., Baradat P., Bervillé A., 2001. Genetic relationships in the olive (*Olea europaea* L.) reflect multilocal selection of cultivars. Theoretical and Applied Genetics, 102: 221–258
- Besnard G., Bervillé A. 2002. On chloroplast DNA variations in the olive (*Olea europaea* L.) complex: comparison of RFLP and PCR polymorphisms. Theoretical and Applied Genetics, 104: 1157–1163
- Besnard G., Khadari B., Baradat P., Bervillé A. 2002a Combination of chloroplast and mitochondrial DNA polymorphism to study cytoplasm genetic differentiation in the olive complex (*Olea europaea* L.). Theoretical and Applied Genetics, 105: 139–144
- Besnard G., Khadari B., Baradat P., Bervillé A. 2002b. *Olea europaea* (Oleaceae) phylogeography based on chloroplast DNA polymorphism. Theoretical and Applied Genetics, 104: 1353–1361
- Besnard G., Henry P., Wille L., Cooke D., Chapuis E. 2007a. On the origin of the invasive olives (*Olea europaea* L., Oleaceae). Heredity, 99: 608–619
- Besnard G., Rubio de Casas R., Vargas P. 2007b. Plastid and nuclear DNA polymorphism reveals historical processes of isolation and reticulation in the olive tree complex (*Olea europaea* L.). Journal of Biogeography, 34: 736–752
- Besnard G., Khadari B., Navascués M., Fernández-Mazuecos M., El Bakkali A., Arrigo N., Baali-Cherif D., Brunini-Bronzini de Caraffa V., Santoni S., Vargas P., Savolainen V. 2013. The complex history of the olive tree: from Late Quaternary diversification

- of Mediterranean lineages to primary domestication in the northern Levant. Proceedings of the Royal Society B, 280: 2012–2833
- Bogani P., Cavalieri D., Petruccelli R., Roselli G. 1994. Identification of olive tree cultivars by using random amplified polymorphic DNA. Acta Horticulturae, 356: 98–101
- Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. 1980. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics, 32: 314–331
- Börner A. 2006. Preservation of plant genetic resources in the biotechnology era. Biotechnology Journal, 1: 1393–1404
- Bracci T., Busconi M., Fogher C., Sebastiani L. 2011. Molecular studies in olive (*Olea europaea* L.): overview on DNA markers applications and recent advances in genome analysis. Plant Cell Reports, 30: 449–462
- Breton C., Terral J.F., Pinatel C., Médail F., Bonhomme F., Bervillé A. 2009. The origins of the domestication of the olive tree. Comptes Rendus Biologie, 332: 1059–1064
- Breton C.M., Bervillé A. 2012. New hypothesis elucidates selfincompatibility in the olive tree regarding S-alleles dominance relationships as in the sporophytic model. Comptes Rendus Biologies, 335: 563–572
- Breton C.M., Farinelli D., Shafiq S., Heslop-Harrison J.S., Sedgley M., Bervillé A.J. 2014. The self-incompatibility mating system of the olive (*Olea europaea* L.) functions with dominance between S-alleles. Tree Genetics & Genomes, 10: 1055–1067
- Bronzini de Caraffa V., Giannettini J., Gambotti C., Maury J. 2002. Genetic relationships between cultivated and wild olives of Corsica and Sardinia using RAPD markers. Euphytica, 123: 263–271
- Brus R. 2004. Drevesne vrste na Slovenskem. Ljubljana, Mladinska knjiga: 374–375 str.
- Busconi M., Foroni C., Corradi M., Bongiorni C., Cattapan F., Fogher C. 2003. DNA extraction from olive oil and its use in the identification of the production cultivar. Food Chemistry, 83: 127–134
- Busconi M., Sebastiani L., Fogher C. 2006. Development of SCAR markers for germplasm characterisation in olive tree (*Olea europaea* L.). Molecular Breeding, 17: 59–68
- Buteler M.I., LaBonte D.R., Jarret R.L., Macchiaveili R.E. 2002. Microsatellite-based paternity analysis in polyploid sweetpotato. Journal of the American Society for Horticultural Science, 127, 3: 92–396
- Caballero J.M., Del Rio C., Barranco D., Trujillo I. 2006. The Olive World Germplasm Bank of Cordoba, Spain, Olea, 25: 14–19
- Cantini C., Cimato A., Sani G. 1999. Morphological evaluation of olive germplasm present in Tuscany region. Euphytica, 109: 173–181
- Cantini C., Cimato A., Autino A., Redi A., Cresti M. 2008. Assessment of the Tuscan olive germplasm by microsatellite markers reveals genetic identities and different discrimination capacity among and within cultivars. Journal of the American Society for Horticultural Science, 133, 4: 598–604

- Carlier J.D., Sousa N.H., Santo T.E., d'Eeckenbrugge G.C., Leitão J.M. 2012. A genetic map of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) including SCAR, CAPS, SSR and EST-SSR markers. *Molecular Breeding*, 29, 1: 245–260
- Carlson J. 2008. Effects of Microsatellite Null Alleles on Assignment Testing. *Journal of Heredity*, 99, 6: 616–623
- Carmona R., Zafra A., Seoane P., Castro A.J., Guerrero-Fernández D., Castillo-Castillo T., Medina-García A., Cánovas F.M., Aldana-Montes J.F., Navas-Delgado I., de Dios Alché J., Claros M.G. 2015. ReprOlive: a database with linked data for the olive tree (*Olea europaea* L.) reproductive transcriptome. *Frontiers in Plant Science*, 6, doi: 10.3389/fpls.2015.00625: 14 str.
- Caroli S., Santoni S., Ronfort J. 2011. AMaCAID: a useful tool for Accurate Marker Choice for Accession Identification and Discrimination. *Molecular Ecology Resources*, 11: 733–738
- Carrier E., 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
- Castelo A.T., Martins W., Gao G.R. 2001. TROLL-Tandem Repeat Occurrence Locator. *Bioinformatics*, 18, 4: 634–636
- Celton J.M., Tustin D.S., Chagné D., Gardiner S.E. 2009. Construction of a dense genetic linkage map for apple rootstocks using SSRs developed from *Malus* ESTs and *Pyrus* genomic sequences. *Tree Genetics and Genomes*, 5: 93–107
- Cercueil A., Bellemain E., Manel S. 2002. PARENTE: computer program for parentage analysis. *Journal of Heredity*, 93: 458–459  
<http://www2.ujf-grenoble.fr/leca/membres/manel.html> (januar 2016)
- Chabane K., Ablett G.A., Cordeiro G.M., Valkoun J., Henry R.J. 2005. EST versus genomic derived microsatellite markers for genotyping wild and cultivated barley. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52: 903–909
- Chaix G., Gerber S., Razafimaharo V., Vigneron P., Verhaegen D., Hamon S. 2003. Gene flow estimation with microsatellites in a Malagasy seed orchard of *Eucalyptus grandis*. *Theoretical and Applied Genetics*, 107: 705–712
- Chapuis M.P., Estoup A. 2007. Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 3: 621–631
- Chen C., Li L., Wei X., Li S., Lei T., Hu H., Wang H., Zhang X. 2005. Development, chromosome location and genetic mapping of EST-SSR markers in wheat. *Chinese Science Bulletin*, 50, 20: 2328–2336
- Chen C., Zhou P., Choi Y.A., Huang S., Gmitter Jr F.G. 2006. Mining and characterizing microsatellites from citrus ESTs. *Theoretical and Applied Genetics*, 112: 1248–1257
- Chen Y., Lin C., Wang C., Wu H., Hwang P. 2007. An optimized procedure greatly improves EST vector contamination removal. *BMC Genomics*, 8, doi: 10.1186/1471-2164-8-416: 11 str.

- Chen C., Bowman K.D., Choi Y.A., Dang P.M., Rao M.N., Huang S., Soneji J.R., McCollum T.G., Gmitter Jr F.G. 2008. EST-SSR genetic maps for *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. *Tree Genetics & Genomes*, 4: 1–10
- Chen C., Bock C.H., Beckman T.G. 2014. Sequence analysis reveals genomic factors affecting EST-SSR primer performance and polymorphism. *Molecular Genetics and Genomics*, 289: 1147–1156
- Choudhary S., Sethy N.K., Shokeen B., Bhatia S. 2009. Development of chickpea EST-SSR markers and analysis of allelic variation across related species. *Theoretical and Applied Genetics*, 118: 591–608
- Chung A.M., Staub J.E., Chen J.F. 2006. Molecular phylogeny of *Cucumis* species as revealed by consensus chloroplast SSR marker length and sequence variation. *Genome* 49: 219–229
- Cicerale S., Conlan X.A., Sinclair A.J., Keast R.S. 2009. Chemistry and Health of Olive oil phenolics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49, 3: 218–236
- 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
- Cloutier S., Miranda E., Ward K., Radovanovic N., Reimer E., Walichnowski A., Data R., Rowland G., Dugid S., Ragupathy R. 2012. *Theoretical and Applied Genetics*, 125, 4: 685–694
- Collani S., Galla G., Ramina A., Barcaccia G., Alagna F., Cáceres E.M., Baldoni L., Muleo R., Perrotta G. 2012. Self-incompatibility in olive: a new hypothesis on the S-locus genes controlling pollen-pistil interaction. *Acta Horticulturae*, 967: 133–140
- Conesa A., Götz S., García-Gómez J.M., Terol J., Talón M., Robles M. 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics Applications Note*, 21, 18: 3674–3676  
<https://www.blast2go.com> (maj 2015)
- Conde C., Agasse A., Silva P., Lemoine R., Delrot S., Tavares R., Geros H. 2007. OeMST2 encodes a monosaccharide transporter expressed throughout olive fruit maturation. *Plant Cell Physiology*, 48, 9: 1299–1308
- Conde C., Delrot S., Geros H. 2008. Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. *Journal of Plant Physiology*, 165: 1545–1562
- Corrado G., Alagna F., Rocco M., Renzone G., Varricchio P., Coppola V., Coppola M., Garonna A., Baldoni L., Scaloni A., Rao R. 2012. Molecular interactions between the olive and the fruit fly *Bactrocera oleae*. *BMC Plant Biology*, 12, doi: 10.1186/1471-2229-12-86: 17 str.
- Cruz F., Julca I., Gómez-Garrido J., Loska D., Marcet-Houben M., Cano E., Galán B., Frias L., Ribeca P., Derdak S., Gut M., Sánchez-Fernández M., García J.L., Gut I.V.,

- Vargas P, Alioto T.S., Gabaldón T. 2016. Genome sequence of the olive tree, *Olea europaea*. *GigaScience*, 5, doi: 10.1186/s13742-016-0134-5: 12 str.
- Cuevas J., Rallo L., Rapoport H.F. 1994. Crop load effects on floral quality in olive. *Scientia Horticulturae*, 59: 123–130
- Cuevas J., Polito V.S. 1997. Compatibility relationships in ‘Manzanillo’ olive. *HortScience*, 32: 1056–1058
- Cuevas J., Diaz-Hermoso A.J., Galián D., Hucso J.J., Pinillos V., Prieto M., Sola D., Polito V.S. 2001. Response to cross pollination and choice of pollinators for the olive cultivars (*Olea europaea* L.) ‘Manzanilla de Sevilla’, ‘Hojiblanca’ and ‘Picual’. *Olivae*, 85: 26–32
- Cuevas J., Polito V.S. 2004. The role of staminate flowers in the breeding system of *Olea europaea* (Oleaceae): an andromonoecious, wind-pollinated taxon. *Annals of Botany*, 93: 547–553
- Cuevas J., Pinillos V., Polito V.S. 2009. Effective pollination period for ‘Manzanillo’ and ‘Picual’ olive trees. *Journal of Horticultural Sciences and Biotechnology*, 84, 3: 370–374
- Culturra N.G.M., Alagna F., Mariotti C., De Marchis F., Pompa A., Bellucci M., Baldoni L. 2014. Isolation and molecular characterization of three acyl carrier protein genes in olive (*Olea europaea* L.). *Tree Genetics & Genomes*, 10, 4: 895–909
- Dakin E.E., Avise J.C. 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93: 504–509
- Dafni A., Firmage D. 2000. Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. *Plant Systematics and Evolution*, 222: 113–132
- Darovec D. 1998. Proizvodnja oljčnega olja kot osrednja gospodarska panoga slovenske Istre v preteklosti. V: *Glasnik ZRS Koper*, Darovec D. (ur.). Koper, Znanstveno-raziskovalno središče Republike Slovenije, 3, 5: 36–49
- Davey J.W., Hohenlohe P.A., Etter P.D. 2011. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Genetics*, 12: 499–510
- De la Rosa R., James C.M., Tobutt K.R. 2002. Isolation and characterisation of polymorphic microsatellites in olive (*Olea europaea* L.) and their transferability to other genera in the Oleaceae. *Molecular Ecology*, 2: 265 – 267
- De la Rosa R., James C.M., Tobutt K.R. 2004. Using microsatellites for paternity testing in olive progenies. *HortScience*, 39: 351–354
- De la Rosa R., Belaj A., Muñoz-Mérida A., Trelles O., Ortíz-Martín I., González-Plaza J.J., Valpuesta V., Beuzón C.R. 2013. Development of EST-derived SSR Markers with Long-core Repeat in Olive and Their Use for Paternity Testing. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 138, 4: 290–296
- Deschamps S., Campbell M. 2009. Utilization of next-generation sequencing platforms in plant genomics and genetic variant discovery. *Molecular Breeding*, 25: 553–570
- DeWoody J., Nason J.D., Hipkins V.D. 2006. Mitigating scoring errors in microsatellite data from wild populations. *Molecular Ecology Notes*, 6: 951–957

- Díaz A., Martín A., Rallo P., De la Rosa R. 2007. Crosscompatibility of the parents as the main factor for successful olive breeding crosses. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 132: 830–835
- Dillon N.L., Innes D.J., Bally I.S.E., Wright C.L., Devitt L.C., Dietzgen A.G. 2014. Expressed Sequence Tag-Simple Sequence Repeat (EST-SSR) Marker Resources for Diversity Analysis of Mango (*Mangifera indica* L.). *Diversity*, 6: 72–87
- Doveri S., Sabino Gil F., Díaz A., Reale S., Busconi M., da Câmara Machado A., Martín A., Fogher C., Donini P., Lee D. 2008. Standardization of a set of microsatellite markers for use in cultivar identification studies in olive (*Olea europaea* L.). *Scientia Horticulturae*, 116: 367–373
- Dresselhaus T., Cordts S., Heuer S., Sauter M., Lörz H., Kranz E. 1999. Novel ribosomal genes from maize are differentially expressed in the zygotic and somatic cell cycles. *Molecular and General Genetics*, 261: 416–427
- Dundar E., Sonmez G.D., Unver T. 2015. Isolation, molecular characterization and functional analysis of OeMT2, an olive metallothionein with a bioremediation potential. *Molecular Genetics & Genomics*, 290, 1: 187–199
- Dutta S., Kumawat G., Singh B.K., Gupta D.K., Singh S., Dogra V., Kaikwad K., Sharma T.R., Raje R.S., Bandhopadhyay T.K., Datta S., Singh M.N., Bashasab F., Kulwal P., Wanjari K.B., Varshney R.K., Cook D.R., Singh N.K. 2011. Development of genic-SSR markers by deep transcriptome sequencing in pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp]. *BMC Plant Biology*, 11, doi: 10.1186/1471-2229-11-17: 13 str.
- Eassa K.B., El-Tweel A.A., Gowda A.M. 2011. Studies on Self- and Cross-pollination for Kalamata olive cultivar grown in a sandy soil. *Journal of Agricultural Research*, 37, 1: 127–130
- El Bakkali A., Haouane H., Moukhli A., Costes E., Van Damme P., Khadari B. 2013. Construction of Core Collections Suitable for Association Mapping to Optimize Use of Mediterranean olive (*Olea europaea* L.) genetic Resources. *PLoS ONE* 8, 5: e61265, doi: 0.1371/journal.pone.0061265: 13 str.
- Ellergren H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5: 435–44
- Essalouh L., El Aabidine Z., Contreras S., Ben Sadok I., Santoni S., Khadari B., Jakse J., Bandelj D. 2014. Genomic and EST Microsatellite Loci Development and Use in Olive: Molecular Tools for Genetic Mapping and Association studies. *Acta Horticulturae*, 1057: 543–550
- Estoup A., Jarne P., Cornuet J.M. 2002. Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology*, 11: 1591–1604
- Fabbri A., Hormaza J.I., Polito V.S. 1995. Random amplified polymorphic DNA analysis of olive cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 120: 538–542

- Fabbri A., Benelli C. 2000. Flower bud induction and differentiation in olive. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75: 131–141
- Fabbri A., Bartolini G., Lambardi M., Kailis S.G. 2004. *Olive Propagation Manual*. Landlinks, Collingwood, Vic
- Fabbri A., Lambardi M., Ozden-Tokatli Y. 2009. Olive breeding. V: Breeding plantation tree crops: tropical species. Jain S.M., Priyadarshan P.M. (eds.), New York, Springer Science + Business Media LLC: 423–468
- FAO 2010. The Second Report on the State of the World's Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Rome, Italy, ISBN 978-92-5-106534-1
- FAOSTAT: Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division. [http://faostat3.fao.org/browse/Q/\\*/E](http://faostat3.fao.org/browse/Q/*/E) (29. jan. 2016)
- Farinelli D., Breton C.M., Famiani F., Bervillé A. 2015. Specific features in the olive self-incompatibility system: A method to decipher S-allele pairs based on fruit settings. *Scientia Horticulturae*, 181: 62–75
- Feng S., Tong H., Chen Y., Wang J., Chen Y., Sun G., He J., Wu Y. 2013. Development of Pineapple Microsatellite Markers and Germplasm Genetic Diversity Analysis. BioMed Research International, Article ID 317912, doi: 10.1155/2013/317912: 11 str.
- Fernández M.P., Núñez Y., Ponz F., Hernáiz S., Gallego F.J., Ibáñez J. 2008. Characterization of sequence polymorphisms from microsatellite flanking regions in *Vitis* spp. *Molecular Breeding*, 22: 455–465
- Ferrão L.F.V., Caixeta E.T., Pena G., Zambolin E.M., Cruz C.D., Zambolin L., Ferrão M.A.G., Sakiyama N.S. 2015. New EST-SSR markers of *Coffea arabica*: transferability and application to studies of molecular characterization and genetic mapping. *Molecular Breeding*, 35, doi: 0.1007/s11032-015-0247-z: 5 str.
- Fontanazza G., Baldoni L. 1990. Proposed programmed for the genetic improvement of the olive. *Olivae*, 34: 32–40
- Frankham R., Ballou J. D., Briscoe D. A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, New York, 617 str.
- Franklin-Tong V.E. 1999. Signaling and the Modulation of Pollen Tube Growth. *The Plant Cell*, 11: 727–738
- Fraser L.G., Harvey C.F., Crowhurst R.N., De Silva H.N. 2004. EST-derived microsatellites from *Actinidia* species and their potential for mapping. *Theoretical and Applied Genetics*, 108: 1010–1016
- Fujimori S., Washio T., Higo K., Ohtomo Y., Murakami K., Matsubara K., Kawai J., Carninci P., Hayashizaki Y., Kikuchi S., Tomita M. 2003. A novel feature of microsatellites in plants: a distribution gradient along the direction of transcription. *FEBS Letters*, 554: 17–22
- Galla G., Barcaccia G., Ramina A., Collani S., Alagna F., Baldoni L., Cultrera M.N., Martinelli F., Sebastiani L., Tonutti P. 2009. Computational annotation of genes

- differentially expressed along olive fruit development. *BMC Plant Biology*, 9, doi: 10.1186/1471-2229-9-128: 17 str.
- Gemas V.J.V., Rijo-Johansen M.J., Tenreiro R., Fevereiro P. 2000. Inter- and Intra-varietal analysis of three *Olea europaea* L. cultivars using the RAPD techniques. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75: 312–319
- Gemas V.J.V., Almadanim M.C., Tenreiro R., Martins A., Fevereiro P. 2004. Genetic diversity in the Olive tree (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) cultivated in Portugal revealed by RAPD and ISSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 51: 501–511
- Gerber S., Mariette S., Streife R., Bodénès C., Kremer A. 2000. Comparison of microsatellites and amplified fragment length polymorphism markers for parentage analysis. *Molecular Ecology*, 9: 1037–1048
- Gerber S., Chabrier P., Kremer A. 2003. FAMOZ: a software for parentage analysis using dominant, codominant and uniparentally inherited markers. *Molecular Ecology Notes*, 3: 479–481  
<http://www.pierrotin.inra.fr/genetics/lab/Software/Famoz/index.html>  
(februar 2016)
- Germaná M.A., Chiancone B., Hammami S.B.M., Rapoport H.F. 2014. Olive embryo in vitro germination potential: role of explant configuration and embryo structure among cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 118: 409–417
- Ghanbari R., Anwar F., Alkharfy K.M., Gilani A.H., Saari N. 2012. Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.)—A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 13: 3291–3340
- Giannoulia K., Banilas G., Hatzopoulos P. 2007. Oleosin gene expression in olive. *Journal of Plant Physiology*, 164, 1: 104–107
- Gil-Amado J.A., Gomez-Jimenez M.C. 2013. Transcriptome Analysis of Mature Fruit Abscission Control in Olive. *Plant & Cell Physiology*, 54, 2: 244–269
- Green P.S. 2002. A revision of *Olea* L. (Oleaceae). *Kew Bulletin*, 57: 91–140
- Grover A., Sharma P.C. 2007. Microsatellite motifs with moderate GC content are clustered around genes on *Arabidopsis thaliana* chromosome 2. *In Silico Biology*, 7: 201–213
- Grover A., Aishwarya V., Sharma P.C. 2007. Biased distribution of microsatellite motifs in the rice genome. *Molecular Genet Genomics*, 277: 469–480
- Guerin J.R., Sweeney S.M., Collins G.G., Sedgley M. 2002. The development of a genetic database to identify olive cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127: 977–983
- Guerin J., Sedgley M. 2007. Cross-pollination in Olive Cultivars. Kingston, Rural Industries Research and Development Corporation: 51 str.
- Guerra D., Lamontanara A., Bagnaresi P., Orrù L., Rizza F., Zelasco S., Beghè D., Ganino T., Pagani D., Cattivelli L., Mazzucotelli E. 2015. Transcriptome changes associated

- with cold acclimation in leaves of olive tree (*Olea europaea* L.). *Tree Genetics & Genomes*, 11, doi: 10.1007/s11295-015-0939-x: 24 str.
- Gupta P.K., Balyan H.S., Sharma P.C., Ramesh B. 1996. Microsatellites in Plants: A new class of molecular markers. *Current Science*, 70, 1: 45–54
- Gupta P.K., Varshney R.K., Sharma P.C., Ramesh B. 1999. Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breeding*, 118: 369–390
- Gupta P.K., Varshney R.K. 2000. The development and use of microsatellite markers for genetics and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica*, 113: 163–185
- Gupta P.K., Rustgi S., Sharma S., Singh R., Kumar N., Balyan H.S. 2003. Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. *Molecular Genetics and Genomics*, 270: 315–323
- Gupta P.K., Rustgi S., Mir R.R. 2008. Array-based high-throughput DNA markers for crop improvement. *Heredity*, 101: 5–18
- Gupta S.K., Gopalakrishna T. 2010. Development of unigenederived SSR markers in cowpea (*Vigna unguiculata*) and their transferability to other *Vigna* species. *Genome*, 53: 508–523
- Gupta S.K., Bansal R., Gopalakrishna T. 2014. Development and characterization of genic SSR markers for mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Euphytica*, 195: 245–258
- Hakim R.I., Grati-Kammoun N., Makhlofi E., Rebaï A. 2010. Discovery and potential of SNP markers in characterization of Tunisian olive germplasm. *Diversity*, 2: 17–27
- Hamman-Khalifa A.M., Castro A.J., Jímenez-López J.C., Rodríguez-García M.I., de Dios Alché J. 2008. Olive cultivar origin is a major cause of polymorphism for Ole e 1 pollen allergen. *BMC Plant Biology*, 8: 10–18
- Hanai L.R., Campos T., Camargo L.E.A., Benchimol L.L., Souza A.P., Melotto M., Carbonell S.A.M., Chioratto A.F., Consoli L., Formighieri E.F., Siqueira M., Tsau S.M., Vieira M.L.C. 2007. Development, characterization, and comparative analysis of polymorphism at common bean SSR loci isolated from genic and genomic sources. *Genome*, 50: 266–277
- Haouane H., El Bakkali A., Moukhli A., Tollen C., Santoni S., Oukabli A., El Modafar C., Khadari B. 2011. Genetic structure and core collectionof the World Olive Germplasm Bank of Marrakech: towards theoptimised management and use of Mediterranean olive geneticresources. *Genetica*, 139, 9, doi: 10.1007/s10709-011-9608-7: 12 str.
- Harrison H.B., Saenz-Agudelo P., Planes S., Jones G.P., Berumen M.L. 2013. Relative accuracy of three common methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology*, 22: 1158–1170
- Hatzopoulos P., Banilas G., Giannoulia K., Gazis F., Nikoloudakis N., Milioni D., Haralampidis K. 2002. Breeding molecular markers and molecular biology of the olive tree. *European Journal of Lipid and Science Technology*, 104: 574–586

- He G.H., Meng R.H., Newman M., Gao G.Q., Pittman R.N., Prakash C.S. 2003. Microsatellites as DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). BMC Plant Biology, 3, doi: 10.1186/1471-2229-3-3: 6 str.
- Hernández M.L., Mancha M., Martínez-Rivas J.M. 2005. Molecular identification of the olive fruit gene mainly responsible for the linoleic acid content in the virgin olive oil. Phytochemistry, 66: 1417–1426
- Hess J., Kadereit W., Vargas P. 2000. The colonization history of *Olea europaea* L. in Macaronesia based on internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequences, randomly amplified polymorphic DNAs (RAPD) and intersimple sequence repeats (ISSR). Molecular Ecology, 9: 857–868
- Hinata K., Nishio T. 1978. S-allele specificity of stigma proteins in *Brassica oleracea* and *B. campestris*. Heredity, 41: 93–100
- Hoffman L., Krueger S. 2009. Rapid DNA Extraction from Plant Seeds for PCR. Epicentre Biotechnologies, 16: 13–14
- Holton T.A., Christopher J.T., McClure L., Harker N., Henry R.J. 2002. Identification and mapping of polymorphic SSR markers from expressed gene sequences of barley and wheat. Molecular Breeding, 9, 2: 63–71
- Hong J.H., Kwon Y.S., Mishra R.K., Kim D.H. 2015. Construction of EST-SSR Databases for Effective Cultivar Identification and Their Applicability to Complement for Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Distinctness Test. American Journal of Plant Sciences, 6: 113–125
- Hu J., Wang L., Li J. 2011. Comparison of genomic SSR and EST-SSR markers for estimating genetic diversity in cucumber. Biologia Planatarum, 55, 3: 577–580
- Huang H., Lu J., Ren Z., Hunter W., Dowd S.E., Dang P. 2011. Mining and validating grape (*Vitis* L.) ESTs to develop EST-SSR markers for genotyping and mapping. Molecular Breeding, 28, 2: 241–254
- Hugues C. 1999. Maslinarstvo Istre/Elaiografia Istriana. Miljković I. (ur.). Zagreb, Ceres: 284 str.
- Iaria D., Chiappetta A., Muzzalupo I. 2016. *De Novo* Transcriptome Sequencing of *Olea europaea* L. to Identify Genes Involved in the Development of the Pollen Tube. Scientific World Journal, 2016, 4305252, doi: 10.1155/2016/4305252: 7 str.
- IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.
- IOC: International olive oil council.  
<http://www.internationaloliveoil.org> (3. avg. 2016)
- Ipek M., Ipek A., Seker M., Gul M.K. 2015. Association of SSR markers with contents of fatty acids in olive oil and genetic diversity analysis of an olive core collection. Genetics and Molecular Research, 14, 1: 2241–2252
- Jamieson A., Taylor S.S. 1997. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. Animal Genetics, 28: 397–400

- Jian Z.H., Liu X.S., Hu J.B., Chen Y.H., Feng J.C. 2012. Mining microsatellite markers from public expressed sequence tag sequences for genetic diversity analysis in pomegranate. *Journal of Genetics*, 91, 3: 353–358
- Jiang G.L. 2013. Molecular Markers and Marker-Assisted Breeding in Plants. V: Agricultural and Biological Sciences “Plant Breeding from Laboratories to Fields”. Andersen S.N. (ed). InTech: 45–84
- Jones A.G., Small C.M., Paczolt K.A., Ratterman N.L. 2010. A practical guide methods of parentage analysis. *Molecular Ecology Resoursec*, 10: 6–30
- Jung S., Abbott A., Jesudurai C., Tomkins J., Main D. 2005. Frequency, type, distribution and annotation of simple sequence repeats in Rosaceae ESTs. *Functional & Integrative Genomics*, 5: 136–143
- Kachroo A., Nasrallah M.E., Nasrallah J.B. 2002. Self-incompatibility in the Brassicaceae: receptor-ligand signaling and cell-to-cell communication. *Plant Cell*, 14: S227–238
- Kalinowski S.T., Taper M.L., Marshall T.C. 2007. Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16: 1099–1106
- Kanehisa M., Goto S. 2000. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 28, 1: 27–30
- Kantety R.V., La Rota M., Matthews D.E., Sorrells M.E. 2002. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. *Plant Molecular Biology*, 48: 501–510
- Katti M.V., Ranjekar P.K., Gupta V.S. 2001. Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences. *Molecular Biology Evolution*, 18, 7: 1161–1167
- Kaur S., Cogan N.O.I., Stephens A., Noy D., Butsch M., Forster J.W., Materne M. 2014. EST-SNP discovery and dense genetic mapping in lentil (*Lens culinaris* Medik.) enable candidate gene selection for boron tolerance. *Theoretical and Applied Genetics*, 127, 3: 703–713
- Kaya H.B., Cetin O., Kaya H., Sahin M., Sefer F., Kahrman A., Tanyolac B. 2013. SNP Discovery by Illumina-Based Transcriptome Sequencing of the Olive and the Genetic Characterization of Turkish Olive Genotypes Revealed by AFLP, SSR and SNP Markers. *PLoS ONE*, 8, 9: e73674, doi: 10.1371/journal.pone.0073674: 17 str.
- Kayesh E., Zhang Y.Y., Liu G.S., Bilkish N., Sun X., Leng X.P. Fang J.G. 2013. Development of highly polymorphic EST-SSR markers and segregation in F1 hybrid population of *Vitis vinifera* L. *Genetics and Molecular Research*, 12, 3: 3871–3878
- Kimura M., Ohta T. 1978. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in Wnite populations. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 75: 2868–2872
- Kofler R., Schlötterer C., Lelley T. 2007. SciRoKo: a new tool for whole genome microsatellite search and investigation. *Bioinformatics*, 23, 13: 1683–1685

- Konieczny A., Ausubel F.M. 1993. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *The Plant Journal for Cell and Molecular Biology*, 4: 403–410
- Koubouris G.C., Metzidakis I.T., Vasilakakis M.D. 2009. Impact of temperature on olive (*Olea europaea* L.) pollen performance in relation to relative humidity and genotype. *Environmental and Experimental Botany*, 67: 209–214
- Koubouris G.C., Breton C.M., Metzidakis I.T., Vasilakakis M.D. 2014. Self-incompatibility and pollination relationships for four Greek olive cultivars. *Scientia Horticulturae*, 176: 91–96
- Koudounas K., Manioudaki M.E., Kourti A., Banilas G., Hatzopoulos P. 2015. Transcriptional profiling unravels potential metabolic activities of the olive leaf non-glandular trichome. *Frontiers in Plant Science*, 6, doi: 10.3389/fpls.2015.00633: 10 str.
- Kumar P., Gupta V.K., Misra A.K., Modi D.R., Pandey B.K. 2009. Potential of molecular markers in plant biotechnology. *Plant Omics Journal*, 2: 141–162
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33, 7: 1870–1874
- Kump B., Svetek S., Javornik B. 1992. Izolacija visokomolekularne DNK iz rastlinskih tkiv. *Zbornik Biotehniške fakultete. Univerza v Ljubljani*, 59: 63–66
- Kumpatha S.P., Mukhopadhyay S. 2005. Mining and survey of simple sequence repeats in expressed sequence tags of dicotyledonous species. *Genome*, 48: 985–998
- La Malfa S., Currò S., Douglas A.B., Brugaletta M., Caruso M., Gentile A. 2014. Genetic diversity revealed by EST-SSR markers in carob tree (*Ceratonia siliqua* L.). *Biochemical Systematics and Ecology*, 55: 205–211
- Langridge P., Chalmers K. 2004. The principle: identification and application of molecular markers. V: *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Molecular Marker Systems in Plant Breeding and Crop Improvement*. Lörz H., Wenzel G (eds.). Berlin, Springer-Verlag, 49: 129–149
- Lanza B., Marsilio V., Martinelli N. 1996. Olive pollen ultrastructure: characterization of exine pattern through image analysis-scanning electron microscopy (IA-SEM). *Scientia Horticulturae*, 65, 4: 283–294
- Lavee S. 1996. Biology and physiology of the olive. V: *World Olive Encyclopedia*. IOOC (ed.). Madrid Spain, International Olive Oil Council: 59–110
- Lavee S.J., Taryan J., Levin J., Haskal A. 2002. The significance of cross-pollination for various olive cultivars under irrigated intensive growing conditions. *Olivae*, 91: 25–36
- Lavee S. 2006. Biennial bearing in olive (*Olea europaea* L.). *Olea*, 25: 5–13
- Lavee S., Avidan B., Ben-Ari G. 2014. Trends in breeding new olive varieties in Israel for quality and economic management. *Agricultural Science*, 5: 701–709

- Lawson M.J., Zhang L. 2006. Distinct patterns of SSR distribution in the *Arabidopsis thaliana* and rice genomes. *Genome Biology*, 7, doi: 10.1186/gb-2006-7-2-r14: 11 str.
- Lee J.M., Nahm S.H., Kim Y.M., Kim B.D. 2004. Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. *Theoretical and Applied Genetics*, 108: 619–627
- Leigh F., Lea V., Law J., Wolters P., Powell W., Donini P. 2003. Assessment of EST- and genomic microsatellite markers for variety discrimination and genetic diversity studies in wheat. *Euphytica*, 133: 359–366
- Levene H. 1949. On a matching problem in genetics. *The Annals of Mathematical Statistics*, 20: 91–94
- Leyva-Pérez M., Valverde-Corredor A., Valderrama R., Jiménez-Ruiz J., Muñoz-Merida A., Trelles O., Barroso J.B., Mercado-Blanco J., Luque F. 2014. Early and delayed long-term transcriptional changes and short-term transient responses during cold acclimation in olive leaves. *DNA Research*, 22, 1: 1–11
- Li Y.C., Korol A.B., Fahima T., Beiles A., Nevo E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11: 2453–2465
- Li Y.C., Korol A.B., Fahima T., Nevo E. 2004. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 21: 991–1007
- Lia V.V., Bracco M., Gottlieb A.M., Poggio L., Confalonieri V.A. 2007. Complex mutational patterns and size homoplasy at maize microsatellite loci. *Theoretical and Applied Genetics*, 115: 981–991
- Liu S.R., Li W.Y., Long D., Hu C.G., Zhang J.Z. 2013. Development and Characterization of Genomic and Expressed SSRs in Citrus by Genome-Wide Analysis. *PloS ONE*, 8, 10: e75149, doi: 10.1371/journal.pone.0075149: 10 str.
- Lleal Albert. SEM close-up view of Olive (*Olea europaea*) pollen at 1400x magnification Wall Art.  
<http://www.greatbigcanvas.com/view/sem-close-up-view-of-olive-olea-europaea-pollen-at-1400x-magnification,1050713/> (maj 2016)
- Loureiro J., Rodriguez E., Costa A., Santos C. 2007. Nuclear DNA content estimations in wild olive (*Olea europaea* ssp. *Europaea* var. *sylvestris* Brot.) and Portuguese cultivars of *O. europaea* using flow cytometry. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54: 21–25
- Lowe A., Harris S., Ashton P. 2004. Ecological Genetics: Design, Analysis, and Application. Oxford, UK, Blackwell Publishing: 466 str.
- Lumaret R., Ouazzani N. 2001. Plant Genetics: Ancient wild olives in Mediterranean forests. *Nature*, 413, doi: doi:10.1038/35099680: 1 str.
- Man Y., Wang Y., Zhang L., Li Z., Qin R., Jiang Z., Sun X., Liu C. 2011. Development of microsatellite markers in *Actinidia arguta* (Actinidiaceae) based on the NCBI data platform. *American Journal of Botany*, 98, 11: 310–15

- Marchese A., Marra F.P., Costa F., Quartararo A., Fretto S., Caruso T. 2016. An investigation of the self- and inter-incompatibility of the olive cultivars ‘Arbequina’ and ‘Koroneiki’ in the Mediterranean climate of Sicily. Australian Journal of Crop Science, 10, 1: 88–93
- Mariotti R., Cultrera N.G.M., Muñoz Diez C., Baldini L., Rubini A. 2010. Identification of new polymorphic regions and differentiation of cultivated olives (*Olea europaea* L.) through plastome sequence comparison. BMC Plant Biology, 10, doi: 10.1186/1471-2229-10-211: 13 str.
- Mariotti R., Cultrera N.G.M., Mousavi S., Baglivo F., Rossi M., Albertini E., Alagna F., Carbone F., Perrotta G., Baldoni L. 2016. Development, evaluation, and validation of new EST-SSR markers in olive (*Olea europaea* L.). Tree Genetics & Genomes, 12, doi: 10.1007/s11295-016-1077-9: 14 str.
- Marra F.P., Caruso T., Costa F., Di Vaio C., Mafrica R., Marchese A. 2013. Genetic relationships, structure and parentage simulation among the olive tree (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) cultivated in Southern Italy revealed by SSR markers. Tree Genetics & Genomes, 9: 961–973
- Martin G.C. 1990. Olive flower and fruit population dynamics. Acta Horticulturae, 286: 141–153
- Martin G.C. 1994. Botany of the olive. V: Olive Production Manual. Ferguson L., Sibbett G.S., Martin G.C. (eds.). California, University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Publication 3353: 19–21
- Martin G.C., Sibbett G.S. 2005. Botany of the olive. V: Olive Production Manual. Sibbett G.S., Ferguson L., Coviello J.L., Lindstrand M. (eds.). California, University of California, Agriculture and Natural Resources: 15–19
- Martin G.C., Ferguson L., Sibbett G.S. 2005. Flowering, pollination, fruiting, alternate bearing, and abscission. V: Olive Production Manual. Sibbett G.S., Ferguson L., Coviello J.L., Lindstrand M. (eds.). Oakland, California, University of California, Agriculture and Natural Resources: 49–54
- Martins-Lopes P., Gomes S., Santos E., Guedes-Pinto H. 2008. DNA markers for Portuguese olive oil fingerprinting. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56: 11786–11791
- Matteucci M., D’Angeli S., Errico S., Lamanna R., Perrotta G., Altamura M.M. 2011. Cold affects the transcription of fatty acid desaturases and oil quality in the fruit of *Olea europaea* L. genotypes with different cold hardiness. Journal of Experimental Botany, 62: 3403–3420
- Matsuoka Y., Mitchell S.E., Kresovich S., Goodman M.M., Doebley J.F. 2002. Microsatellites in Zea-variability, patterns of mutations, and use for evolutionary studies. Theoretical and Applied Genetics, 104: 436–450
- McCubbin A., Kao T.H. 1996. Self-incompatibility and pollen rejection in angiosperms. V: In vitro Haploid Production in Higher Plants. Jain S.M., Soproy S.K., Veilleux R.E. (eds.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishing: 225–253

- McGregor S.E. 1976. Tree Fruits & Nuts and Exotic Tree Fruits & Nuts – Olive. V: Insects Pollination of Cultivated Crop plants. The First and Only Virtual Beekeeping Book Updated Continously, 401 str.  
(<https://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/20220500/OnlinePollinationHandbook.pdf>) (maj 2016)
- Meglécz E., Costedoat C., Dubt V., Gilles A., Malausa T., Pech N., Martin J.F. 2010. QDD: a user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. *Bioinformatics*, 26, 3: 403–404
- Metzgar D., Liu L., Hansen C., Dybvig K., Wills C. 2002. Domain level differences in microsatellite distribution and content result from different relative rates of insertion and deletion mutations. *Genome Research*, 12: 408–413
- Metzker M.L. 2010. Sequencing technologies-the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11: 31–46
- Meze D. 1959. Pozeba oljke v Primorju leta 1956. *Geografski zbornik*, 5: 85–139
- Mignone F., Gissi C., Liuni S., Pesole G. 2002. Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biology*, 3, doi: 10.1186/gb-2002-3-3-reviews0004: 10 str.
- Milne I., Bayer M., Cardle L., Shaw P., Stephen G., Wright F., Marshall D. 2010. Tablet-next generation sequence assembly visualization. *Bioinformatics*, 26, 3: 401–402
- Minch E. 1997. MICROSAT, Version 1.5b. Stanford University Medical Center, Stanford
- Mir R.R., Varshney R.K. 2013. Future Prospects of Molecular Markers in Plants. V: Molecular markers in plants. Henry R.J. (eds.). UK, Blackwell Publishing Ltd.: 170–190
- MKGP. 2011. Register kmetijskih gospodarstev in evidenca dejanske rabe kmetijskih in gozdarskih zemljišč. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano (izpis iz baze podatkov)
- Mogg R., Batley J., Hanley S., Edwards D., O'Sullivan H., Edwards K.J. 2002. Characterization of the Xanking regions of *Zea mays* microsatellites reveals a large number of useful sequence polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics*, 105: 532–543
- Mohler V., Schwarz G. 2005. Genotyping tools in plant breeding: from restriction fragment length polymorphisms to single nucleotide polymorphisms. V: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Lorz H., Wenzel G. (eds.). Berlin, Springer: 23–38
- Montemurro C., Pasqualone A., Simeone R., Sabetta W., Blanco A. 2007. AFLP molecular markers to identify virgin olive oils from single Italian cultivars. *European Food Research and Technology*, 226: 1439–1444
- Montemurro C., Mazzoni M.M., Pasqualone A., Fanelli V., Sabetta W., di Renzo V. 2015. Traceability of PDO Olive Oil “Terra di Bari” Using High Resolution Melting. *Journal of Chemistry*, 2015: 1–7

- Mookerjee S., Guerin J., Collins G., Ford C., Sedgley M. 2005. Paternity analysis using microsatellite markers to identify pollen donors in an olive grove. *Theoretical and Applied Genetics*, 111: 1174–1182
- Morales M.T., Angerosa F., Aparicio R. 1999. Effect of the extraction conditions of virgin olive oil on the lipoxygenase cascade: chemical and sensory implications. *Grasas Aceites*, 50: 114–121
- Morgante M., Rafalski A., Biddle P., Tingey S., Olivieri A.M. 1994. Genetic mapping and variability of seven soybean simple sequence repeat loci. *Genome*, 37: 763–769
- Moutier N., Garcia G., Féral S., Salls J.-C. 2001. Pollination control in olive orchards. *Olivae*, 86: 35–37
- Moutier N. 2002. Self-fertility and inter-compatibilities of sixteen olive varieties. *Acta Horticulturae*, 586: 209–212
- Muleo R., Colao M.C., Miano D., Cirilli M., Intrieri M.C., Baldoni L., Rugini E. 2009. Mutation scanning and genotyping by highresolution DNA melting analysis in olive germplasm. *Genome*, 52: 252–260
- Muñoz-Mérida A., González-Plaza J.J., Cañada A., Blanco A.M., García-López M.D., Rodríguez J.M., Pedrola L., Sicardo M.D., Hernández M.L., De la Rosa R., Belja A., Gil-Borja M., Luque F., Martínez-Rivas J.M., Pisano D.G., Trelles O., Valpuesta V., Beuzón C.R. 2013. De Novo Assembly and Functional Annotation of the Olive (*Olea europaea*) Transcriptome. *DNA Research*, 20: 93–108
- Muzzalupo I., Perri E. 2002. Recovery and characterisation of DNA from virgin olive oil. *European Food Research and Technology*, 214: 528–531
- Muzzalupo I., Lombardo N., Musacchio A., Noce M.E., Pellegrino G., Perri E., Sajjad A. 2006. DNA sequence analysis of microsatellite markers enhances their efficiency for germplasm management in an Italian olive collection. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 131: 352–359
- Muzzalupo I., Perri E. 2008. Genetic characterization of olive germplasms by molecular markers. *European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 2: 60–68
- Muzzalupo I., Vendramin G.G., Chiapetta A. 2014. Genetic Biodiversity of Italian Olivea (*Olea europaea*) Germplasm Analyzed by SSR Markers. *Scientific World Journal*, 2014, 296590, doi: 10.1155/2014/296590: 12 str.
- NCBI: National Center for Biotechnology Information. U.S. National Library of Medicine <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest> (21.12.2016)
- Neal P.R., Anderson G.J. 2004. Does the ‘Old Bag’ Make a Good ‘Wind Bag’?: Comparison of Four Fabrics Commonly Used as Exclusion Bags in Studies of Pollination and Reproductive Biology. *Annals of Botany*, 93: 603–607
- Nei M. 1987. Genetic distance and molecular phylogeny. V: Population genetics and fishery management. Ryman N., Utter F. (eds.). Seattle, University of Washington Press: 193–223
- Newbigin E., Anderson M.A., Clarke A.E. 1993. Gametophytic self-incompatibility systems. *Plant Cell*, 5, 10: 1315–1324

- Ogrin D. 2004. Oljka v Slovenskem Primorju: v primežu podnebja in trenutnih družbeno-ekonomskih razmer. Geografski obzornik, 51, 2: 4–10
- Ogrin D. 2010. Oljkarstvo v slovenskih obsredozemskih pokrajinh v odnosu do sedanjega, preteklega in prihodnjega podnebja: vpliv spremenjanja podnebja na oljkarstvo v Sloveniji. Geografija v šoli, 19, 3: 18–25
- Oliveira E.J., Pádua J.G., Zucchi M.I., Vencovsky R., Vieira M.L.C. 2006 Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. Genetics and Molecular Biology, 29: 294–307
- Oliveira G.A.F., Dantas J.L.L., Oliveira E.J. 2015. Informativeness of minisatellite and microsatellite markers for genetic analysis in papaya. Genetica, 143, 5, doi: 10.1007/s10709-015-9860-3: 19 str.
- Omrani-Sabbaghi A., Shahriari M., Falahati-Anbaran M., Mohammadi S.A., Nankali A., Mardi M., Ghareyazie B. 2007. Microsatellite markers based assessment of genetic diversity in Iranian olive (*Olea europaea* L.) collections. Scientia Horticulturae, 112, 4: 439–447
- Orlandi F., Romano B., Fornaciari M. 2005. Relationship between pollen emission and fruit production in olive (*Olea europaea* L.). Grana, 44: 98–103
- Osborne C.P., Chuine I., Viner D., Woodward F.I. 2000. Olive phenology as a sensitive indicator of future climatic warming in the Mediterranean. Plant, Cell and Environment, 23: 701–710
- Owen C.A., Bita E.C., Banilas G., Hajjar S.E., Sellinakis V., Aksoy U., Hepaksoy S., Chamoun R., Talhook S.N., Metzidakis I., Hatzopoulos P., Kalaitzis P. 2005. AFLP reveals structural details of genetic diversity within cultivated olive germplasm from the Eastern Mediterranean. Theoretical and Applied Genetics, 110: 1169–1176
- Ozgenturk N.O., Oruc F., Sezerman U., Kucukural A., Vural Korkut S., Toksoz F., Cemal U. 2010. Generation and Analysis of Expressed Sequence Tags from *Olea europaea* L. Comparative and Functional Genomics, 2010, 757512, doi: 10.1155/2010/757512: 9 str.
- Padilla M.N., Hernández M.L., Sanz C., Martínez-Rivas J.M. 2009. Functional characterization of two 13-lipoxygenase genes from olive fruit in relation to the biosynthesis of volatile compounds of virgin olive oil. Journal of Agricultural Food Chemistry, 57: 9097–9107
- Padilla M.N., Hernández M.L., Pérez A.G., Sanz C., Martínez-Rivas J.M. 2010. Isolation, expression, and characterization of a 13-hydroperoxidelyase gene from olive fruit related to the biosynthesis of the main virgin olive oil aroma compounds. Journal of Agricultural Food Chemistry, 58: 5649–5657
- Padilla M.N., Hernández M.L., Sanz C., Martínez-Rivas J.M. 2012. Molecular cloning, functional characterization and transcriptional regulation of a 9-lipoxygenase gene from olive. Phytochemistry, 74: 58–68

- Padilla M.N., Hernández M.L., Sanz C., Martínez-Rivas J.M. 2014. Stress-dependent regulation of 13-lipoxygenases and 13-hydroperoxide lyase in olive fruit mesocarp. *Phytochemistry*, 102: 80–88
- Paetkau D., Calvert W., Stirling I., Strobeck C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology*, 4: 347–354
- Palmieri-Thiers C., Canaan S., Brunini V., Lorenzi V., Tomi F., Desseyn J.L., Garscha U., Oliw E.H., Berti L., Maury J., 2009. A lipoxygenase with dual positional specificity is expressed in olives (*Olea europaea* L.) during ripening. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1791: 339–346
- Paran I., Michelmore R. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical Applied Genetics*, 85: 985–993
- Parra R., Paredes M.A., Sanchez-Calle I.M., Gomez-Jimenez M.C. 2013. Comparative transcriptional profiling analysis of olive ripe-fruit pericarp and abscission zone tissues shows expression differences and distinct patterns of transcriptional regulation. *BMC Genomics*, 14, doi: 10.1186/1471-2164-14-866: 20 str.
- Parida S.K., Anand Raj Kumar K., Dalal V., Singh N.K., Mohapatra T. 2006. Unigene derived microsatellite markers for the cereal genomes. *Theoretical Applied Genetics*, 112: 808–817
- Parida S.K., Kalia S.K., Sunita K., Dalal V., Hemaprabha G., Selvi A., Pandit A., Singh A., Gaikwad K., Sharma T.R., Srivastava P.S., Singh N.K., Mohapatra T. 2009. Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane. *Theoretical and Applied Genetics*, 118: 327–338
- Pasqualone A., Caponio F., Blanco A. 2001. Inter-simple sequence repeat DNA markers for identification of drupes from different *Olea europaea* L. cultivars. *European Food Research and Technology*, 213: 240–243
- Pasqualone A., Montemurro C., Summo C., Sabetta W., Caponio F., Blanco A. 2007. Effectiveness of microsatellite DNA markers in checking the identity of protected designation of origin extra virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 3857–3862
- Pearson C.E., Edamura K.N., Cleary J.D. 2005. Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nature Reviews Genetics*, 6: 729–742
- Pemberton J.M., Slate J., Bancroft D.R., Barrett J.A. 1995. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Molecular Ecology*, 7: 249–252
- Perica S., Brown P.H., Connell J.H., Nyomora A.M.S., Dordas C., Hu H.N., Stangoulis J. 2001. Foliar boron application improves flower fertility and fruit set of olive. *Horticultural Science*, 36: 714–716
- Pérez-Jiménez F., Ruano J., Pérez-Martinez P., Lopez-Segura F., Lopez-Miranda J. 2007. The influence of olive oil on human health: not a question of fat alone. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51: 1199–1208

- Podatki o oljkarstvu v Sloveniji. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano RS.
- [http://www.mkgp.gov.si/si/delovna\\_podrocja/kmetijstvo/kmetijski\\_trgi/oljeno\\_olje](http://www.mkgp.gov.si/si/delovna_podrocja/kmetijstvo/kmetijski_trgi/oljeno_olje) (9. maj, 2016)
- Poghosyan Z., Haralampidis K., Martsinkovskaya A.I., Murphy D.J., Hatzopoulos P. 1999. Developmental regulation and spatial expression of a plastidial fatty acid desaturase from *Olea europaea*. Plant Physiology and Biochemistry, 37: 109–119
- Poghosyan Z.P., Giannoulia K., Katinakis P., Murphy D.J., Hatzopoulos P. 2005. Temporal and transient expression of olive enoyl-ACP reductase gene during flower and fruit development. Plant Physiology and Biochemistry, 43: 37–44
- Poljuha D., Sladonja B., Šetic E., Milotic A., Bandelj D., Jakše J. Javornik B. 2008. DNA fingerprinting of olive varieties in Istria (Croatia) by microsatellite markers. Scientia Horticulturae, 115: 223–230
- Powell W., Machray G.C., Provan J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trends in Plant Science, 1: 215–222
- Prasanth V.P., Chandra S. 2006. ALS-Binary: A program for converting allele size in microsatellite markers into 0-1 (binary) data. Biometrics. ICRISAT, India  
<http://www.iwmigmia.org/bt-software-bingeno.htm> (oktober 2015)
- Rajendrakumar P., Biswal A.K., Balachandran S.M., Srinivasarao K., Sundaram R.M. 2007. Simple sequence repeats in organellar genomes of rice: frequency and distribution in genic and intergenic regions. Bioinformatics, 23: 1–4
- Rallo L., Martin G.C. 1991. The Role of Chilling in Releasing Olive Floral Buds from Dormancy. Journal of the American Society for Horticultural Science, 116, 6: 1058–1062
- Rallo L., Torreno P., Vargas A., Alvarado J. 1994. Dormancy and alternate bearing in olive. Acta Horticulturae, 356: 127–134
- 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
- Rallo L., Cuevas J. 2010. Fruiting and production. V: Olive Growing. Barranco D., Fernández-Escobar R., Rallo L. (eds.). Australia, RIRDC/AOA: 113–145
- Rapoport H.F. 2010. Botany and morphology. V: Olive Growing. Barranco D., Fernández-Escobar R., Rallo L. (eds.). Australia, RIRDC/AOA: 33–57
- Rassmann K., Schlotterer C., Tautz D. 1991. Isolation of simple sequence loci for use in polymerase chain reactionbased DNA fingerprinting. Electrophoresis, 12: 113–118
- Reale S., Doveri S., Díaz A., Angiolillo A., Lucentini L., Pilla F., Martín A., Donini P., Lee D. 2006. SNP-based markers for discriminating olive (*Olea europaea* L.) cultivars. Genome, 49: 1193–1205
- Rešetič T., Štajner N., Bandelj D., Javornik B., Jakše J. 2013. Validation of candidate reference genes in RT-qPCR studies of developing olive fruit and expression analysis of four genes involved in fatty acids metabolism. Molecular Breeding, 32: 211–222

- Robledo-Arnuncio J.J., Gil L. 2005. Patterns of pollen dispersal in a small population of *Pinus sylvestris* L. revealed by total-exclusion paternity analysis. *Heredity*, 94: 13–22
- Rohlf F.J. 1998. NTSYS: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.02. Applied Biostatistics Inc., Setauket, New York (programska oprema)
- Rodríguez-García M.I., M'rani-Alaoui M., Fernández M.C. 2003a. Behavior of storage lipids during development and germination of olive (*Olea europaea* L.) pollen. *Protoplasma*, 221: 237–244
- Rodríguez-García M.I., Alaoui M.M., Diaz J.D., Fernandez M.D. 2003b. Observations on microtubules and nuclei motility in the pollen tube of olive (*Olea europaea* L.). *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 45: 97–101
- Rud S. 2003. Expressed sequence tags: alternative or complement to whole genome sequences? *Trends in Plant Science*, 8, 7: 321–329
- Rugini E., Baldoni R. 2005. *Olea europaea* Olive. V: Biotechnology of Fruit and Nut Crops. Litz R.E. (eds.). Oxfordshire, CABI Publishing: 404–428
- Rugini E., De Pace C., Gutiérrez-Pesce P., Muleo R. 2011. Olea. V: Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Temperate Fruits. Kole C. (eds.). Berlin Heidelberg, Springer-Verlag: 79–117
- Rungis D., Berube Y., Zhang J., Ralph S., Ritland C.E., Ellis B.E., Douglas C., Bohlmann J., Ritland K. 2004. Robust simple sequence repeat markers for spruce (*Picea* spp.) from expressed sequence tag. *Theoretical and Applied Genetics*, 109: 1283–1294
- Sabino Gil F., Busconi M., da Câmara Machado A., Fogher C. 2006. Development and characterization of microsatellite loci from *Olea europaea*. *Molecular Ecology Notes*, 6: 1275–1277
- Sahu J., Sen P., Choudhury M.D., Barooah M., Modi M.K., Talukdar A.D. 2012. Towards and efficient computationl mining approach to identify EST-SSR markers. *Bioinformation: Discovery at the interface of the physical and biological sciences*, 8, 4: 201–202
- Sancin V. 1990. Velika knjiga o oljki. Trst, Založništvo tržaškega tiska: 319 str.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 12: 5463–5467
- Santos Macedo E., Cardoso H.G., Hernández A., Peixe A.A., Polidoros A., Ferreira A., Cordeiro A., Arnholdt-Schmitt B. 2009. Physiologic responses and gene diversity indicate olive alternative oxidase as a potential source for markers involved in efficient adventitious root induction. *Physiologia Plantarum*, 137: 532–552
- Sanz-Cortés F., Martínez-Calvo J., Badenes M.L., Bleiholder H., Hack H., Llácer G., Meier U. 2002. Phenological growth stages of olive trees (*Olea europaea*). *Annal of Applied Biology*, 140: 151–157
- 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
- Schlötterer C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109, 6: 365–371
- Schlötterer C., Harr B. 2001. Microsatellite Instability. *Encyclopedia of Life Sciences*. <http://www.els.net> (januar 2017)
- Schlötterer C. 2004. The evolution of molecular markers-just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics*, 5: 63–69
- Schopfer C.R., Nasrallah M.E., Nasrallah J.B. 1999. The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science*, 286: 1697–1700
- Schuelke M. 2000. An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18: 233–234
- Secchi F., Lovisolo C., Uehlein N., Kaldenhoff R., Schubert A. 2007. Isolation and functional characterization of three aquaporins from olive (*Olea europaea* L.). *Planta*, 225: 381–392
- Sedgley M. 1994. ‘Self-incompatibility in woody horticultural species’. V: Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants. Williams E.G., Clarke A.E., Knox R.B. (eds.). Dordrecht, the Netherlands, Kluwer Academic Publishers: 141–163
- Sefc K.M., Lopes M.S., Mendonca D., Rodriguez dos Santos M., Laimer da Camara Machado M., da Camara Machado A. 2000. Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea*) and their characterisation in Italian and Iberian olive trees. *Molecular Ecology*, 9: 1171–1193
- Seifi E.J., Guerin J., Kaiser B., Sedgley M. 2008. Inflorescence architecture of olive. *Scientia Horticulturae*, 116: 273–279
- Seifi E. 2008. Sexual compatibility of olive: assessed by pollen tube. V: Self-Incompatibility of Olive. Seifi E. (ed.). Australia, Adelaide, University of Adelaide: 64–76
- Seifi E., Guerin J., Kaiser B., Sedgley M. 2011. Sexual compatibility and floral biology of some olive cultivars. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 39, 2: 141–151
- Seifi E., Guerin, J., Kaiser, B., Sedgley, M. 2012. Sexual compatibility of the olive cultivar ‘Kalamata’ assessed by paternity analysis. *Spanish Journal of Agriculture Research*, 10, 3: 731–740
- Seifi E., Guerin J., Kaiser B., Sedgley M. 2015. Flowering and fruit set in olive: a review. *Iranian Journal of Plant Physiology*, 5, 2: 1263–1272
- Senan S., Kizhakayil D., Sasikumar B., Sheeja T.E. 2014. Methods for Development of Microsatellite Markers: An Overview. *Notulae Scientia Biolgicae*, 6, 1: 1–13
- Serrano I., Olmedilla A. 2012. Histochemical location of key enzyme activities involved in receptivity and self-incompatibility in the olive tree (*Olea europaea* L.). *Plant Science*, 197: 40–49

- Shangguan L., Li X., Ning N., Wang Y., Zhang Z., Fang J. 2011. Development of EST-SSR markers in apricot. *Acta Horticulturae Sinica*, 38: 43–54
- Služba za Register kmetijskih gospodarstev. 2016. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano RS.
- Song Y., Jiang X., Zhang M., Wang Z., Bo W., An X., Zhang D., Zhang Z. 2012. Differences of EST-SSR and genomic-SSR markers in assessing genetic diversity in poplar. *Forestry Studies in China*, 14, 1: 1–7
- Sorek R., Safer H.M. 2003. A novel algorithm for computational identification of contaminated EST libraries. *Nucleic Acids Research*, 31, 3: 1067–1074
- Spinardi A., Bassi D. 2012. Olive fertility as affected by crosspollination and boron. *The Scientific World Journal*, 2012, 375631, doi: 10.1100/2012/375631: 8 str.
- SRX215662: Olive fruit transcriptome. NCBI Resources.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRX215662> (april, 2012)
- Stark A.H., Madar Z. 2002. Olive oil as a functional food: epidemiology and nutritional approaches. *Nutrition Reviews*, 60, 6: 170–176
- Stein J.C., Howlett B., Boyes D.C., Nasrallah M.E., Nasrallah J.B. 1991. Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88: 8816–8820
- Stepien L., Mohler V., Bocianowski J., Koczyk G. 2007. Assessing genetic diversity of Polish wheat (*Triticum aestivum*) varieties using microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54: 1499–1506
- Sušnik A., Valher A. 2012. Neugodni vplivi vremena na kmetijstvo leta 2012. *Ujma*, 27: 62–70
- Temnykh S., DeClerck G., Lukashova A., Lipovich L., Cartinhour S., McCouch S. 2001. Computational and Experimental Analysis of Microsatellites in Rice (*Oryza sativa* L.): Frequency, LengthVariation, Transposon Associations, and Genetic Marker Potential. *Genome Research*, 11: 1441–1452
- Therios I.N. 2009. Olives. *Crop Production Science in Horticulture*. Series No 18. CAB International, Wallingford, U.K.: 409 str.
- Thiel T., Michalek W., Varshney R.K., Graner A. 2003. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 411–422
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 22: 4673–4680
- Trifonov E.N. 2004. Tuning function if tandemly repeating sequences: a molecular device for fast adaptation. V: *Evolutionary theory and processes: Modern horizons*. Wasser S.P. (ed.). Netherlands, Springer: 115–138

- Trujillo I., Ojeda M.A., Urdiroz N.M., Potter D., Barranco D., Rallo L., Diez C.M. 2014. Identification of the Worldwide Olive Germplasm Bank of Córdoba (Spain) using SSR and morphological markers. *Tree Genetics & Genomes*, 10: 141–155
- Ugrinović K., Štampar F. 1996. Fertilization of olive (*Olea europaea* L.) cultivars ‘Istrska belica’, ‘Pendolino’ and ‘Leccino’ by different pollinators. *Acta Horticulturae*, 474: 767–770
- Uredba Komisije (ES) št. 148/2007 z dne 15. februarja 2007 o vnosu nekaterih imen v Register zaščitenih označb porekla in zaščitenih geografskih označb. 2007. Uradni list Evropske unije, L46: 14–17
- Uylaşer V., Yıldız G. 2014. The Historical Development and Nutritional Importance of Olive and Olive Oil Constituted an Important Part of the Mediterranean Diet. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54, 8: 1092–1101
- Vaiman D., Mercier D., Moazai G., 1994. A set of 99 cattle microsatellite, characterization, synteny mapping and polymorphism. *Mammalian Genome* 5: 288–297
- Valdes A.M., Slatkin M., Freimer N.B. 1993. Allele Frequencies at Microsatellite Loci: The Stepwise Mutation Model Revisited. *Genetics*, 133: 737–749
- Vandeputte M. 2012. An accurate formula to calculate exclusion power of marker sets in parentage assignment. *Genetics Selection Evolution*, 44, 1, doi: 10.1186/1297-9686-44-36: 4 str.
- Vargas P., Kadereit J.W. 2001. Molecular fingerprinting evidence (ISSR, Inter-Simple Sequence Repeats) for a wild status of *Olea europaea* L. (Oleaceae) in the Eurosiberian North of the Iberian Peninsula. *Flora*, 196: 142–152
- Varshney R.K., Thiel T., Stein N., Langridge P., Graner A. 2002. In silico analysis on frequency and distribution of microsatellites in ESTs of some cereal species. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 7: 537–546
- Varshney R.K., Graner A., Sorrells M.E. 2005a. Genomics-assisted breeding for crop improvement. *Trends in Plant Science*, 10: 621–630
- Varshney R.K., Granner A., Sorrells M. 2005b. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology*, 23, 1: 48–55
- Varshney R.K., Sigmund R., Börner A., Korzun V., Stein N., Sorrells M.E., Langridge P., Graner A. 2005c. Interspecific transferability and comparative mapping of barley EST-SSR markers in wheat, rye and rice. *Plant Science*, 168, 1: 195–202
- Varshney R.K., Nayak S.N., May, G.D., Jackson S.A. 2009. Next-generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding. *Trends in Biotechnology*, 27: 522–530
- Vendramin E., Dettori M.T., Giovinazzi J., Micali S., Quarta R., Verde I. 2007. A set of EST-SSRs isolated from peach fruit transcriptome and their transportability across *Prunus* species. *Molecular Ecology Notes*, 7: 307–310
- Vesel V., Baruca Arbeiter A., Bandelj D. 2016. Zbiranje in vrednotenje genskih virov oljk v Sloveniji. V: *Zbornik referatov 4. slovenskega sadjarskega kongresa z mednarodno*

- udeležbo. 4. slovenski sadjarski kongres z mednarodno udeležbo, Krško, 20. - 21. januar 2017. Hudina M. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Strokovno sadjarsko društvo Slovenije: 37–44
- Vietina M., Agrimonti C., Marmiroli M., Bonas U., Marmiroli N. 2011. Applicability of SSR markers to the traceability of monovarietal olive oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91: 1381–1391
- Villalba M., Batanero E., Monsalve R.I., Gonzalez de la Pena M.A., Lahoz C., Rodriguez R. 1994. Cloning and expression of Ole e I, the major allergen from olive tree pollen. Polymorphism analysis and tissue specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 269: 15217–15222
- Villalba M., Rodriguez R., Batanero E. 2014. The spectrum of olive pollen allergens. From structures to diagnosis and treatment. *Methods*, 66, 1: 44–45
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407–4414
- Vuletin Selak G., Perica S., Ban S.G., Radunic M., Poljak M. 2011. Reproductive Success after Self-pollination and Cross-pollination of Olive Cultivars in Croatia. *HortScience*, 46, 2: 186–191
- Vuletin Selak G., Perica S., Ban S.G., Poljak M. 2013. The effect of temperature and genotype on pollen performance in olive (*Olea europaea* L.). *Scientia Horticulturae*, 156: 38–46
- Vuletin Selak G., Cuevas J., Ban S.G., Perica S. 2014. Pollen tube performance in assessment of compatibility in olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 165: 36–43
- Wagner H.W., Sefc K.M. 1999. IDENTITY 1.0. Centre for Applied Genetics, University of Agricultural Sciences Vienna (programska oprema)
- Waits L.P., Luikart G., Taberlet P. 2001. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology*, 10: 249–256
- Wallander E., Albert V.A. 2000. Phylogeny and classification of Oleaceae based on rps 16 and trnL-F sequence data. *American Journal of Botany*, 87: 1827–1841
- Wang M.L., Barkley N.A., Jenkins T.M. 2009a. Microsatellite markers in plants and insects. Part I. Applications of biotechnology. *Genes Genomes Genomics*, 3: 54–67
- Wang Z., Gerstein M., Snyder M. 2009b. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10: 57–63
- Wei L.B., Zhang H.Y., Zheng Y.Z., Guo W.Z., Zhang T.Z. 2008. Developing EST-derived microsatellites in sesame (*Sesamum indicum* L.). *Acta Agronomica Sinica*, 34, 12: 2077–2084
- Weising K., Nybom H., Wolff K., Khal G. 2005. DNA Fingerprinting in Plants: principles, methods, and applications. 2<sup>nd</sup> ed. New York, CRC Press: 230 str.

- Wiesman Z., Avidan N., Lavee S., Quebedeaux B. 1998. Molecular characterization of common olive varieties in Israel and the West bank using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123: 837–841
- Wilson I.G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 10: 3741–3751
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531–6535
- Wu S.B., Collins G., Sedgley M. 2002. Sexual compatibility within and between olive cultivars. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 77, 6: 665–673
- Woodhead M., McCallum S., Smith K., Cardle L., Mazzitelli L., Graham J. 2008. Identification, characterization and mapping of simple sequence repeat (SSR) markers from raspberry root and bud ESTs. *Molecular Breeding*, 22: 555–563
- Xiao J., Zhao J., Liu M., Liu P., Dai L., Zhao Z. 2015. Genome-Wide Characterization of Simple Sequence Repeat (SSR) Loci in Chinese Jujube and Jujube SSR Primer Transferability. *PLoS ONE*, 10, 5: e0127812, doi: 10.1371/journal.pone.0127812: 13 str.
- Yeh F.C., Boyle T.J.B. 1997. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany*, 129: 157–163
- Zafra A., Jimenez-Lopez J.C., Carmona R., Claros G., de Dios Alché J. 2016. Transcriptome-Based Identification of a Seed Olive Legumin (11S Globulin). Characterization of Subunits, 3D Modelling and Molecular Assessment of Allergenicity. V: Bioinformatics and Biomedical Engineering. 4<sup>th</sup> International Conference, Granada, Spain, April 20 – 22, 2016. Ortuño F., Rojas I. (eds.). Switzerland, Springer International Publishing: 59–70
- Zane L., Bargelloni L., Patarnello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11: 1–16
- Zapata T.R., Arroyo M.T.K. 1978. Plant reproductive ecology of a secondary deciduous tropical forest in Venezuela. *Biotropica*, 10: 221–230
- Zelasco S., Salimonti A., Baldoni L., Mariotti R., Preece J.E., Aradhya M., Koehmstedt A.M. 2014. Efficiency of SSR markers for exploring olive germplasm diversity through a genetic comparison between the USDA-NCGR and the CRA-OLI olive collections. *Acta Horticulturae*, 1057: 585–592
- Zhao Y., Williams R., Praksah C.S., He G. 2013. Identification and characterization of gene-based SSR markers in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *BMC Plant Biology*, 12, doi: 10.1186/1471-2229-12-237: 8 str.
- Zhang L.D., Yuan D.J., Yu S.W., Li Z.G., Cao Y.F., Miao Z.Q., Qian H.M., Tang K.X. 2004. Preference of simple sequence repeats in coding and non-coding regions of *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics*, 20: 1081–1086

- Zhang H., Wei L., Miao H., Zhang T., Wang C. 2012. Development and validation of genic-SSR markers in sesame. *BMC Genomics*, 13, doi: 10.1186/1471-2164-13-316: 11 str.
- Zhang M., Fan L., Liu O., Song Y., Wei S., Zhang S., Wu J. 2013. A Novel Set of EST-Derived SSR Markers for Pear and Cross-Species Transferability in Rosaceae. *Plant Molecular Biology Reporter*, 32: 290–302
- Zhang M., Mao W., Zhang G., Wu F. 2014. Development and Characterization of Polymorphic EST-SSR and Genomic SSR Markers for Tibetan Annual Wild Barley. *PLoS ONE*, 9, 4: e94881, doi: 10.1371/journal.pone.0094881: 10 str.
- Zheng Y., Zhao L.J., Gao J.P., Fei Z.J. 2011. iAssembler: a package for de novo assembly of Roche-454/Sanger transcriptome sequences. *BMC Bioinformatics*, 12, doi: 10.1186/1471-2105-12-453: 8 str.
- Zhivotovsky L.A., Feldman M.W. 1995. Microsatellite variability and genetic distances. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 92: 11549–11552
- Zienkiewicz A., Jiménez-López J., Zienkiewicz K., de Dios Alché J., Rodríguez-García M. 2011. Development of the cotyledon cells during olive (*Olea europaea* L.) in vitro seed germination and seedling growth. *Protoplasma*, 248: 751–765
- Zohary D., Spiegel-Roy P. 1975. Beginnings of fruit growing in the Old World. *Science*, 187: 319–327
- Zohary D., Hopf M. 2000. Fruit trees and nuts. V: Domestication of plants in the old World. 3<sup>rd</sup> edition. Oxford, Oxford University Press: 142–151

## ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici, izr. prof. dr. Dunji Bandelj, za spremljanje mojega dela, za vso strokovno pomoč pri praktičnem delu ter napotke in kritike pri nastajanju doktorske naloge. Hvala za ves trud, spodbudne besede in podporo.

Najlepša hvala predsednici komisije, prof. dr. Branki Javornik, ter članoma komisije, prof. dr. Jerneju Jakšetu in prof. dr. Jelki Šuštar Vozlič, za strokovno oceno doktorske naloge.

Iskrena hvala doc. dr. Tomažu Oniču za lektoriranje angleškega besedila.

Hvala sodelavcema, Matjažu Hladniku in Tei Knap, za njuno pomoč pri reševanju računalniških zagat in dobro voljo.

Prisrčna hvala Neviu in Viti za potrežljivost, spodbudo in vse ure, ki sta jih preživelaa sama.

Najlepša hvala mami Sonji za lektoriranje doktorskega dela in obema z očetom, da sta Viti polepšala počitniške dni.

Hvala Mici za dobro voljo in za ekspresno nudenje varstva za Vito.

Iskrena hvala vsem!

## PRILOGA A

### Poravnavna referenčnega zaporedja EST 'Istrske belice' in sekvenciranih alelov pri 46 lokusih EST-SSR (pika pod zaporedjem označuje ohranjenost baz; mikrosatelitski motiv je krepko zapisan)

#OeUP-01-EST-IstrskaBelica #OeUP-01-Moraiolo-203bp	TGTCTCATGC <u>CAGATAAAACA</u> GTAAATACAC AACCAAAAGC TAACC <b>AAGAA</b> <b>GAAGAAGAAG</b> <b>AAGAAGAAGA</b> ..... . . . . . . . . . . . . . . . T . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#OeUP-01-EST-IstrskaBelica #OeUP-01-Moraiolo-203bp	<b>AGAAGAAGGG</b> GTCTTCTCT CTCACACATA TAGACAGAAC TTTGTTACAC ACAAAATTAAA GCAAACAAAT ----- .
#OeUP-01-EST-IstrskaBelica #OeUP-01-Moraiolo-203bp	AGATTAAATT ACATTACATG GGTGAATAGT ATTGACTAGA ACACTGTTCA GTTTTGCTTA <u>TTAGTTTG</u> ..... . . . . . . . . . . . . . . . A . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#OeUP-01-EST-IstrskaBelica #OeUP-01-Moraiolo-203bp	<u>GGATTGCTGC</u> .....
#OeUP-02-EST-IstrskaBelica #OeUP-02-Moraiolo-207bp #OeUP-02-LeccioDelCorno-212bp	TTTGTGCGCTT <u>GCAGATTCCC</u> GGGAGCTTT GTATGGTCTT AGTTCTCTGG ACGATGACAT TAAATCATTG ..... . . . . . . . . . . . . . . . A . . . . . . . . . . . . . . . . . . ..... . . . . . . . . . . . . . . . A . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#OeUP-02-EST-IstrskaBelica #OeUP-02-Moraiolo-207bp #OeUP-02-LeccioDelCorno-212bp	TATGGGTGCT GCCCGCGAAC TGAGTTAAA TTATATCATT CCTTGATGTT GCGTATCAGT GAGAGGAAAA .G . . . . T . . . A . . . . . . . . . G . . . A . . . . C . . . .
#OeUP-02-EST-IstrskaBelica #OeUP-02-Moraiolo-207bp #OeUP-02-LeccioDelCorno-212bp	TCCCTCGAGAA ACTGAGATGT TAT <b>GCTGCTG</b> <b>CTGCTGCTGC</b> <b>TGCTGGTGCT</b> AGGATTCCGA <u>CAA</u> CTGGTAA ..... .
#OeUP-02-EST-IstrskaBelica #OeUP-02-Moraiolo-207bp #OeUP-02-LeccioDelCorno-212bp	<u>GGGAG</u> .....

Baruca Arbeiter A. Razvoj ... funkcijskih markerjev za genetske študije oljke (*Olea europaea* L.).

Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2017

Baruca Arbeiter A. Razvoj ... funkcijskih markerjev za genetske študije oljke (*Olea europaea* L.).

Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2017

---

#OeUP-06-EST-IstrskaBelica	<u>TGAAGTTCCA</u> AGCAGTCCAA ATGGTGTAAT GGATGGATTA TTCTTCAGTT CCGATAAGCTC AAACGATTG
#OeUP-06-Picholine-144bp	.....
#OeUP-06-EST-IstrskaBelica	TGGGGAGTGA CATCGTGCAT <b>TTCTTCTTCT</b> <b>TCTTCTTCTT</b> <b>CTTCTTCTTC</b> <b>TTCGTGAGT</b> CATCAGCCAC
#OeUP-06-Picholine-144bp	.....
#OeUP-06-EST-IstrskaBelica	<u>TGTTGAAGAA</u> AGAG
#OeUP-06-Picholine-144bp	.....
#OeUP-07-EST-IstrskaBelica	ATTGATCACA CGGGAATCGG CATAAAATGC CATTGT--AC TTAAGAAAGC CC-TGGTGTG TGTGTGTGT <b>G</b>
#OeUP-07-Samo-209bp	.....
#OeUP-07-Arbequina-211bp	.....
#OeUP-07-EST-IstrskaBelica	----- <b>AGAGAGAGAG</b> <b>AGAGAGAGAG</b> ATTGAAATCT TTCTATATTT ATGTGTATAT
#OeUP-07-Samo-209bp	TGTGTGTGTG AGAGAGAG--
#OeUP-07-Arbequina-211bp	TGTGTGTGTG AGAGAGAGAG
#OeUP-07-EST-IstrskaBelica	GTTCTGAAAG AACTTAGTGT GGTTTGTGTT TGTTTACACT TGAAATTGC <u>ACAGCTTGG</u> TTGGATTGTG
#OeUP-07-Samo-209bp	.....
#OeUP-07-Arbequina-211bp	.....
#OeUP-07-EST-IstrskaBelica	<u>TT</u>
#OeUP-07-Samo-209bp	..
#OeUP-07-Arbequina-211bp	..
#OeUP-08-EST-IstrskaBelica	<u>AACGCTCAAG</u> TTCGGTGTTC AGTGC GTTAT TGCTGGTTTG GTGGCCTCGA CTGCTGAAAG TTGGGATGAT
#OeUP-08-AscolanaTenera-196bp	.....
#OeUP-08-EST-IstrskaBelica	TCTGTGCCGT GTTTGCATC TGTACCATGT TAGGTTGTAG ATTCTGTCCA CTTGCTGCA TGTTTCCGAA
#OeUP-08-AscolanaTenera-196bp	.....
#OeUP-08-EST-IstrskaBelica	TGCACCTTGT GAGTT <b>TGCT</b> <b>GCTGCTGCTG</b> <b>CTGCTGCTGG</b> ATGGGCATCA TGCCACCGGA TTGG
#OeUP-08-AscolanaTenera-196bp	.....

#OeUP-09-EST-IstrskaBelica	<u>TGCTTAGAGC CAGAGGACGA</u> TCCCCAGCTT GGTATTCAACC GGCAGAT <b>TGA TGATGATGAT</b> <b>GATGATGATG</b>
#OeUP-09-LeccioDelCorno-141bp	.....
#OeUP-09-EST-IstrskaBelica	<b>ATTATTATTG ACTTATTGTC</b> TTTTATCATC CTCCGTAAA TCTACTTGGT AGAAGATTAT <u>GATGGTGAA</u>
#OeUP-09-LeccioDelCorno-141bp	-----C. .... G.....A.....
#OeUP-09-EST-IstrskaBelica	<u>AATGGATTG GGG</u>
#OeUP-09-LeccioDelCorno-141bp	.....
#OeUP-10-EST-IstrskaBelica	<u>ACCGGAGCTG AGAATATCCA</u> TAAAC-GCTT CCTGAGTAAG AAATGAGATT GAAGCGTGTA CTCTATTT-
#OeUP-10-Lecino-218bp	.....A.....
#OeUP-10-Moraiolo-212bp	.....A.....G.....T
#OeUP-10-EST-IstrskaBelica	ACTCTCATCA CACATCACCT GGTTCTCTGA TTTGTAACGT TGTTT-GAA AGGCTAGCTT CCAGTTCATT
#OeUP-10-Lecino-218bp	.....T.....
#OeUP-10-Moraiolo-212bp	.....T.....
#OeUP-10-EST-IstrskaBelica	TAGCTCGTCC ATATCGAGAT <b>CGTCGTCGTC</b> <b>GTCGTCGTCG</b> TCAACGTCAT TGATATCACG <u>AGTAGTGGCA</u>
#OeUP-10-Lecino-218bp	.....A..A.....A.....
#OeUP-10-Moraiolo-212bp	.....T.....
#OeUP-10-EST-IstrskaBelica	<u>GTGGAAGA</u>
#OeUP-10-Lecino-218bp	.....
#OeUP-10-Moraiolo-212bp	.....
#OeUP-11-EST-IstrskaBelica	<u>ATAGTAACCA CCAGGCCAT</u> CAGAGCCGT A GTAGTCTCG GAATAAACTG CCTCGACCGG CTTCTCGTGT
#OeUP-11-LeccioDelCorno-162bp	.....A.....
#OeUP-11-EST-IstrskaBelica	TCCTTGAT GGTGAAACAG GTGGTGGTGC TTCTCTTCAG CCA--- <b>TGGT GGTGGTGGTG</b> <b>GTGGTGGTGA</b>
#OeUP-11-LeccioDelCorno-162bp	....C.....TGG.....
#OeUP-11-EST-IstrskaBelica	<u>TGCAATTAA TGACAATCAC</u>
#OeUP-11-LeccioDelCorno-162bp	.....

Baruca Arbeiter A. Razvoj ... funkcijskih markerjev za genetske študije oljke (*Olea europaea* L.).

Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2017

---

#OeUP-12-EST-IstrskaBelica #OeUP-12-Athena-151bp	<u>GAGCTGCTGG GATAGGACTG GAAAGTTGGT CTAACCTGAA GAAATACCCT TTTCTATTCA AAATTTGTGA</u> .....
#OeUP-12-EST-IstrskaBelica #OeUP-12-Athena-151bp	TATACACT <b>GT</b> <b>TATGTATGT</b> <b>ATGTATGTAT</b> <b>GT</b> <b>ATCATATC AGCTATATAT TCATTTCCAC GCTAGAA<u>CTT</u></b> .....
#OeUP-12-EST-IstrskaBelica #OeUP-12-Athena-151bp	<u>GTAACGTGAG GGATCGAG</u> .....
#OeUP-13-EST-IstrskaBelica #OeUP-13-Athena-166bp #OeUP-13-Oblica-162bp	<u>CAATAACCCC ATCAGCAGCC ACTGCACATT GGTAATTGTA TAATATAAAA TCAAGAGCAG AAACACCATC</u> .....
#OeUP-13-EST-IstrskaBelica #OeUP-13-Athena-166bp #OeUP-13-Oblica-162bp	CACGCCCGTA <b>TATGTATGTA</b> <b>TGTATGTATG</b> <b>TATGTATGTG</b> CTTTAGAGTG AGAGTAAACA TGTGAAGATG .....
#OeUP-13-EST-IstrskaBelica #OeUP-13-Athena-166bp #OeUP-13-Oblica-162bp	AATAAGAATT <u>GACTGCAAGG TTTTAATGGA CT</u> .....
#OeUP-14-EST-IstrskaBelica #OeUP-14-Oblica-157bp #OeUP-14-Pendolino-153bp	<u>TTCCCTTTCG CTTGAAGGTA CGGTTTCTTT TACAACTAGA TACATTTTG TGTACACAAG CTATTAAAT</u> ..... T..... T..... T.....
#OeUP-14-EST-IstrskaBelica #OeUP-14-Oblica-157bp #OeUP-14-Pendolino-153bp	CCCCATCCCC ATCA <b>ACACAC</b> <b>ACACACAC</b> <b>ACACACTCCA</b> TGCTACACGC ACTGGCGACT CATATT <u>CGA</u> .....
#OeUP-14-EST-IstrskaBelica #OeUP-14-Oblica-157bp #OeUP-14-Pendolino-153bp	<u>CTAAAGCGCC ATCCACAC</u> .....

Baruca Arbeiter A. Razvoj ... funkcijskih markerjev za genetske študije oljke (*Olea europaea* L.).

Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2017

---

#OeUP-15-EST-IstrskaBelica                   TCTGGGTTG CTAATTGTAG GAAGGTTGTG AAATGTTGTT ATAGTTCATT AGTAAGAATA CATTAAACAA  
#OeUP-15-SantaCaterina-190bp                 .....  
#OeUP-15-Arbequina-184bp                     .....  
  
#OeUP-15-EST-IstrskaBelica                   AAGCTGTAGC ACTTTTATG GGCTGGGTG TAAAAACATG TTAGGATGTG GAAAGTCAGG CGCGGCGGTT  
#OeUP-15-SantaCaterina-190bp                 .....  
#OeUP-15-Arbequina-184bp                     .....  
  
#OeUP-15-EST-IstrskaBelica                   **GTGGTGGTGG TGGTGGTGGT GTCGGATTAA GCTTTATGAT GAAGGAAA**  
#OeUP-15-SantaCaterina-190bp                 .....  
#OeUP-15-Arbequina-184bp                     .....  
  
#OeUP-16-EST-IstrskaBelica                   CCCACCTCCA AGCCTCAGTA ACATACACTC ACATTCATT GACTTCTCTC TCTCTCTCTC TCTCTGCACT  
#OeUP-16-Leccione-246bp                       .....  
  
#OeUP-16-EST-IstrskaBelica                   GAATTTCAA GATAGCATCA ACAGTGCATT ATGGTATTGC TCAAACTTA AGTCATGTTT GGTTGGAGAG  
#OeUP-16-Leccione-246bp                       .....  
  
#OeUP-16-EST-IstrskaBelica                   TATCAAAGAA GTAAAATT TGTTCATTAT ACTGTTGATC ACTTCATACC AAACATGCAC TAAGAGTTAA  
#OeUP-16-Leccione-246bp                       .....  
  
#OeUP-16-EST-IstrskaBelica                   AGCAAAATTAA ATTGACAA ATTTCTTGAT GCACGTGGC  
#OeUP-16-Leccione-246bp                       .....  
  
#OeUP-17-EST-IstrskaBelica                   TCTGGCCTGA GACCTTAAAC AGTTTCAGAA GAAATGTCGA GAGAGAGAGA GAGAGAGAGA TTAGAGATAA  
#OeUP-17-Itrana-158bp                         .....  
  
#OeUP-17-EST-IstrskaBelica                   TCAAATCTAC GTACTCGAGA TGAGAAATT TTAAGCTAAG GAAGACCACA GATATATAAA GTGGACCACT  
#OeUP-17-Itrana-158bp                         .....  
AC...A...  
  
#OeUP-17-EST-IstrskaBelica                   TAAATTCCAT CCAATGAAAT TACTCCACG  
#OeUP-17-Itrana-158bp                         .....

#OeUP-18-EST-IstrskaBelica      TACCCGTTTC CCTTCACTTG CCTTCTTTT **CCTCCTCCTC** **CTCCTCCTCC** **TCCTCCTCGA** ATGCTCAGCC  
#OeUP-18-Cipressino-189bp      ..... .... .... .... .... .... T. ....-.... ....  
#OeUP-18-Storta-177bp      ..... .... .... .... .... -..... -..... ....  
  
#OeUP-18-EST-IstrskaBelica      ACACCAAACC TGAGAACATCCG GGCTCGACCA CAGCCATGTA AACAGCTAGT GTTTTACTTC CATGACATT  
#OeUP-18-Cipressino-189bp      ..... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... ....  
#OeUP-18-Storta-177bp      ..... A..... .... .... .... .... .... .... .... .... ....  
  
#OeUP-18-EST-IstrskaBelica      TTTACAACGG CCACAACCTCC AAGAACATGCAA CTGCTGCCAT TGTAGGGTCA CCAGCT  
#OeUP-18-Cipressino-189bp      ..... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... ....  
#OeUP-18-Storta-177bp      ..... .... .... .... .... .... .... .... .... ....  
  
#OeUP-19-EST-IstrskaBelica      TACAATTCAT CTGCGGCATC TGCCCAATTCA ACAATAAGCT AATACACGAA CAGAGTTCCA ATTAAATAG  
#OeUP-19-Frantoio-175bp      ..... .... .... .... .... .... .... .... .... .... ....  
  
#OeUP-19-EST-IstrskaBelica      **TGAGAGAGAG** **AGAGAGAGAG** AAGAACAGAA ACAAGGAAAA ACTCCTAAAC ATAGAGAATA AGGAAACAAA  
#OeUP-19-Frantoio-175bp      ..... .... .... .... -..... .... .... .... .... .... .... .... ....  
  
#OeUP-19-EST-IstrskaBelica      GTGAAGGTAA GGTTTAGCA TACCACAGCA AATCAATCGA AGCC  
#OeUP-19-Frantoio-175bp      AGA..A.... .... .... .... G.... ....  
  
#OeUP-20-EST-IstrskaBelica      ACCAACCGAG CAAAGCAAAA ATGGAGTCAT ATTCCAAGTT GAAACTG**TTC** **TTCTTCTTCT** **TCTTCTTCTC**  
#OeUP-20-Pendolino-206bp      ..... GT..... ....-.... C. G.--G.AC. .TTCT.C... .... ....-....  
#OeUP-20-Buga-212bp      ..... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... ....  
  
#OeUP-20-EST-IstrskaBelica      TCTCCTCTCT CTCTTGTCA TCTCAACTTC TCTCTACAAA CACCACACCT ACAGTATACG AAGTCCTCGA  
#OeUP-20-Pendolino-206bp      ..CTT..... .... .... .... .... .... .... .... .... .... ....  
#OeUP-20-Buga-212bp      ..CT..... .... .... .... .... .... .... .... .... .... ....  
  
#OeUP-20-EST-IstrskaBelica      AAAATTGAC CTTCCAAGAG GGCTCTTGCC AGATTCAGTC ACTTCCTACA CACTCTCAGA CGATGGCAA  
#OeUP-20-Pendolino-206bp      ..... .... .... .... .... .... .... .... .... .... ....  
#OeUP-20-Buga-212bp      ..... .... .... .... .... .... .... .... .... .... ....

Baruca Arbeiter A. Razvoj ... funkcijskih markerjev za genetske študije oljke (*Olea europaea* L.).

Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2017

---

#OeUP-21-EST-IstrskaBelica      GGCTGAAGTG AAAGCAAAGG CAAGGCCGGC TGGTTCCAT TTGGATACAT TGAAAGACGG GAGCGTGTTC  
#OeUP-21-Samo-198bp                .....  
  
#OeUP-21-EST-IstrskaBelica      TTGCAAGCAA GGTAGCCGAA GTTTCTAAA CTGTTGTGCT AATTTGTT- GCAGTTCTGT ATCCCATG**AC**  
#OeUP-21-Samo-198bp                .....  
  
#OeUP-21-EST-IstrskaBelica      **ACACACACAC ACACACACAC ACACACACTA TTGTTGTACC AGTACATCCC ACTTGTCCGC**  
#OeUP-21-Samo-198bp                .....  
  
#OeUP-22-EST-IstrskaBelica      TTAGATTCAA AGGGCGGCTA AAAACTAGGG GCAGAGAG**G** **AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGACAGAG**  
#OeUP-22-Coratina-157bp            .....  
  
#OeUP-22-EST-IstrskaBelica      ACAGAGAAAGT GGAAATGACT CTGGGGTTAA TCAACGCGAA TCCGGTGGTC ACGCTAAGAG AAAGGGTTGC  
#OeUP-22-Coratina-157bp            .....  
  
#OeUP-22-EST-IstrskaBelica      CGCACTGAGA ACCTCATGAT GACGATGCCA TAGATCCTC  
#OeUP-22-Coratina-157bp            .....  
  
#OeUP-23-EST-IstrskaBelica      CAATTGCTGC TGCTGACTTC AAAAAACTCT ATGTGAAATT GAAGAAGCAA TGGGATATTG AAGAAGGAGA  
#OeUP-23-Picholine-197bp            .....  
  
#OeUP-23-EST-IstrskaBelica      TAGCTGGAAA TTCATGATGA ACCAAAGACC TGCAGGT**AGA AGAAGAAGAA GAAGAAGAAA** ATGATGATA  
#OeUP-23-Picholine-197bp            .....  
  
#OeUP-23-EST-IstrskaBelica      AGAAACAAAGC TGAAAAATTTC ATATTCTAA TGTATATACA TGGAAGGGAG GAACTGAATG  
#OeUP-23-Picholine-197bp            .....

Baruca Arbeiter A. Razvoj ... funkcijskih markerjev za genetske študije oljke (*Olea europaea* L.).

Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2017

---

#OeUP-24-EST-IstrskaBelica      ACCAGATGAA AACTCGTGAT CTTGTCAAAA CAATTTAATA ACATGGTATC TCACAATT-A ATAAGTAGAT  
#OeUP-24-SantaCaterina-191      ..... . .... -C.. ATCTGC TGTC...C.T .T..... . ....T. ....-....

#OeUP-24-EST-IstrskaBelica      CAATGAT**CAG CAGCAGCAGC AGCAGCAGCA** AAA-GGGAGA ACTTCAATAA ATCAAATTTC AGTGAGAACT  
#OeUP-24-SantaCaterina-191      ..... . .... . .... .A..... . .... . .... . ....

#OeUP-24-EST-IstrskaBelica      TATTCTACAG GAGGTAAGGC CCAGCCTTAG CTGCTGGCTG CTAGACGAAC GTAT  
#OeUP-24-SantaCaterina-191      ..... . .... . .... . .... . .... . ....

#OeUP-25-EST-IstrskaBelica      AACACATTTG CACCATTCCA TATTTCACT TTAAAATAAA ACAACTAAA AGAAGTTCAA AAACTCAGAA  
#OeUP-25-Samo-178bp      ..... . .... . .... . .... -.... . .... . .... . ....

#OeUP-25-EST-IstrskaBelica      ACTATTGAGA AAAATCACA CAGGCGTAAA AAGTTTATCA AGTAAATGAT TCGTCTATCA TCAAAGG**ATC**  
#OeUP-25-Samo-178bp      ..... . .... . .... . .... -.... . .... . ....

#OeUP-25-EST-IstrskaBelica      **ATCATCATCA TCATCATCAT** ATAATGAGGG AAGAACCAA TTGA  
#OeUP-25-Samo-178bp      ..... . .... . .... . .... . ....

#OeUP-26-EST-IstrskaBelica      AAGGAAGTAG CAGCACCAAGT TGTTAATAGA ACGGTTAAAA CGGGAAATTC AAAGAAAATA GAAGCTATGG  
#OeUP-26-Picholine-186bp      ..... . .... . .... A..... . .... . .... -.... . .... . ....

#OeUP-26-Frantoio-189bp      ..... . .... . .... . .... . .... . .... . .... . ....

#OeUP-26-EST-IstrskaBelica      **ATGATGATGA TGATGATGAT** GA---GGTGG AGGAGACAGT GGATGAAGAA GATTATGATA ATGACGCTT  
#OeUP-26-Picholine-186bp      ..... . .... . .... . .... . .... . .... . .... . .... G.....

#OeUP-26-Frantoio-189bp      ..... . .... . .... TGA..... . .... . .... . .... . ....

#OeUP-26-EST-IstrskaBelica      TACTTCGAAA TTTTCTGGTA AAAACAAAGG AAAAGCCAGG AAAGGAGGGA  
#OeUP-26-Picholine-186bp      ..... . .... . .... . .... . .... . .... . ....

#OeUP-26-Frantoio-189bp      ..... . .... . .... . .... . .... . ....

#OeUP-27-EST-IstrskaBelica #OeUP-27-SantaCaterina-172bp	<u>GGCTCACCC</u> T TTCAGTTCA TCCCCAAATT <b>TTCTTCTTCT</b> <b>TCTTCTTCTT</b> <b>CTTCTTC</b> ATT CCTAGCAAAT .....
#OeUP-27-EST-IstrskaBelica #OeUP-27-SantaCaterina-172bp	TCCCCAAACTA CTAACTATAA TATCCTAGCA AAGACAAGTG CAGATTCCA ACAAAATTTC AATTAAATT .....
#OeUP-27-EST-IstrskaBelica #OeUP-27-SantaCaterina-172bp	ACAAAAGAAA GGAAGCTATG <u>GATGCTGATT</u> CATGGGCTG .....
#OeUP-28-EST-IstrskaBelica #OeUP-28-Picholine-157bp #OeUP-28-Samo-163bp	<u>TTTTAGTTCA</u> AACTACATAG <u>GAACGTATCC</u> ATATATTAAT TAAGAACGAA AACAA <b>AGAGA</b> <b>GAGAGAGAGA</b> .....
#OeUP-28-EST-IstrskaBelica #OeUP-28-Picholine-157bp #OeUP-28-Samo-163bp	<b>GAGAGATTAG</b> AAAATAGAAA TTCGCTAAGA GTTAGAAAAA GTAGTATTAA ATCAAATCAT AATAATTAT .....
#OeUP-28-EST-IstrskaBelica #OeUP-28-Picholine-157bp #OeUP-28-Samo-163bp	<u>AACCATAAGG</u> CACCAGCTTG .....

Baruca Arbeiter A. Razvoj ... funkcijskih markerjev za genetske študije oljke (*Olea europaea* L.).

Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2017

---

#OeUP-29-EST-IstrskaBelica

GTCCTGCCCTT CAAGATCCAC CACAAATACC CTTCCCATCT CTCT-**CTTC** **ACACACACAC**

#OeUP-29-Moraiolo-211bp

..... T.....

#OeUP-29-NocelaraDelBelice-209bp

..... -C.T T.....

#OeUP-29-EST-IstrskaBelica

**ACACACACAG** AGGGATTGC TTGAGCCGAA ATCACACACA CAAAATTATA CCGATAATTG

#OeUP-29-Moraiolo-211bp

..... G. .... T.....

#OeUP-29-NocelaraDelBelice-209bp

..... .....

#OeUP-29-EST-IstrskaBelica

ATGTAAATTAA ATTAAGCAGA TTAAGTACAA TTTTAATT TTGTCGTGG GTATGGAATG

#OeUP-29-Moraiolo-211bp

..... -..... T.A.....

#OeUP-29-NocelaraDelBelice-209bp

..... -..... T.A.....

#OeUP-29-EST-IstrskaBelica

GAAGAGAAAT TTGGATAAGT ATCTCAGGCC ACCGC

#OeUP-29-Moraiolo-211bp

....G..... .....

#OeUP-29-NocelaraDelBelice-209bp

..... .....

#OeUP-30-EST-IstrskaBelica

AGAGTCACAC TCGTCCCTAC CATTATAGTA TATTCAAGGAG GCAGACTCAT CATCATCCCT CCTATATA

#OeUP-30-Picholine-192

G..... G. .AGA.T.....

#OeUP-30-EST-IstrskaBelica

GAECTACAGAA **ACACACACAC** **ACACACACAC** ACTTAGCGGT CGAATCAAGC AGTGATCGCT ACATAATTAT

#OeUP-30-Picholine-192

..... G..... --.....

#OeUP-30-EST-IstrskaBelica

AGGTCTTTA AGTTCCCTCA GTACTTCAAC CATAAATGTT ACACGCGCGA TTCA

#OeUP-30-Picholine-192

..... .....

Baruca Arbeiter A. Razvoj ... funkcijskih markerjev za genetske študije oljke (*Olea europaea* L.).

Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2017

---

#OeUP-31-EST-IstrskaBelica #OeUP-31-Pendolino-206bp	<u>CATTTCCGA CCAACTGATG AAATTCAA</u> A TAAATCAACA AAAGAATTG CAGTACCTTA TGATTTCT .....
#OeUP-31-EST-IstrskaBelica #OeUP-31-Pendolino-206bp	GCATAAAGAT CTTATTTTA AGAAATACTA TTAAAGAAC ATAAGAAACA GAGAATCCAG TACTCTAAC .....
#OeUP-31-EST-IstrskaBelica #OeUP-31-Pendolino-206bp	AACAGATCAT ACAAAA <b>ACCA CCACCAC</b> <b>CACCAC</b> ACTACAGAAA CAAATAGCAA <u>CCTAACCGCA</u> .....
#OeUP-31-EST-IstrskaBelica #OeUP-31-Pendolino-206bp	<u>AGAAGA</u> .....
#OeUP-32-EST-IstrskaBelica #OeUP-32-Frantoio-174bp #OeUP-32-Buga-171bp	<u>ACGAACCGTG GCAGTACATT</u> TATCACAACA TGTTGAGACA ATCTGACGT <b>A</b> <b>GAAGAAGAAG AAGAAGAAGA</b> .....
#OeUP-32-EST-IstrskaBelica #OeUP-32-Frantoio-174bp #OeUP-32-Buga-171bp	CAATGATGCA AACGATGGTG AATCGTGCAC ATGTGCATGC ATCAAACCTCT TCCTAGGGAA GGGTACTACA .....
#OeUP-32-EST-IstrskaBelica #OeUP-32-Frantoio-174bp #OeUP-32-Buga-171bp	GACCACAAAG GCAAGTCATA <u>CAGGCAAAGG GAAGG</u> .....

Baruca Arbeiter A. Razvoj ... funkcijskih markerjev za genetske študije oljke (*Olea europaea* L.).

Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2017

---

#OeUP-33-EST-IstrskaBelica      ACGTCAACCA TGCTTCAACC TCCTATCATC AGTGAGGAAC ATTTGTCCAC ATTGAAAAAT GATTCAATTG  
#OeUP-33-IstrskaBelica-220bp      ..... . .... . .... . .... . .... . .... . .... . .... . ....  
#OeUP-33-Pendolino-226bp      ..... . .... . .... . .... . .... . .... . .... . .... . ....  
  
#OeUP-33-EST-IstrskaBelica      AAATGTTCAA GGTATTCTT TTACTT**TCAT** **CATCATCATC** **ATCATCATGA** TT----- -TGTCTGGGA  
#OeUP-33-IstrskaBelica-220bp      ..... . .... . .... . .... . .... . .... . .... . .... . .... . ....  
#OeUP-33-Pendolino-226bp      ..... T.. . .... . .... . .... . .... C. .CATGATT-- -.....  
  
#OeUP-33-EST-IstrskaBelica      AGTAAAACCT AGTATCCAA AATATAATT TTCTTGCAAT GTGACTTTGC TGTGATGTTT GTAGACTATT  
#OeUP-33-IstrskaBelica-220bp      ..... . .... . .... . .... . .... . .... . .... . .... . ....  
#OeUP-33-Pendolino-226bp      ..... . .... . .... . .... C. . .... . .... . .... . ....  
  
#OeUP-33-EST-IstrskaBelica      ATGGCTGCTT CGGTACTGA  
#OeUP-33-IstrskaBelica-220bp      ..... . .... . ....  
#OeUP-33-Pendolino-226bp      ..... . .... . ....  
  
#OeUP-34-EST-IstrskaBelica      CCTTCATAGG CAAAATGGTC AAGTGCCAG CTGGGCTGAA AGAGCTCATC AAATCTT-GA TGAACTCACA  
#OeUP-34-Cipressino-217bp      ..... . .... A. .... . .... . .... A....G. .... A.... . .... T.. . ....  
  
#OeUP-34-EST-IstrskaBelica      GAA-CCCACC ATTGCAAAAG CAATGAAAAC TCCCAAAACC AAAGACCCCA TTGAAATTGG AACAGAAGAC  
#OeUP-34-Cipressino-217bp      ...A.... C. .... . .... A. .... . .... . .... . ....  
  
#OeUP-34-EST-IstrskaBelica      GCCATTGATT **GAGAGAGAGA** **GAGAGAGAGA** **GAGAC**----- ----- -TTCTACTTC TCTGCAAATG  
#OeUP-34-Cipressino-217bp      ..... . .... . .... . .... . .... GAGAGA GAGAAAAAAA A. .... . ....  
  
#OeUP-34-EST-IstrskaBelica      CTTTGGTG  
#OeUP-34-Cipressino-217bp      ..... . .... . ....

Baruca Arbeiter A. Razvoj ... funkcijskih markerjev za genetske študije oljke (*Olea europaea* L.).

Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2017

---

#OeUP-35-EST-IstrskaBelica	<u>GGTGGGGTCT</u> GAATATATGT CATA #OeUP-35-NocelaraDelBelice-225	CATACATATT TATTTTGTT TCATAGTATT TAATTGATCG CTCTTACAA .....
#OeUP-35-EST-IstrskaBelica	<u>TTCTTTGGC</u> TTTCTGCCAG CTTGTGGATT GGACATTACA GCACTATATT GTGACAACCT ATCAC #OeUP-35-NocelaraDelBelice-225	CTATG .....
#OeUP-35-EST-IstrskaBelica	<u>TGGGAATT</u> CTGATTTCGA TAGATTCTAC <b>GATTATTATT ATTATTATTA</b> TTTTTGGTT <u>CTTGTCGTAA</u>	..... .....
#OeUP-35-EST-IstrskaBelica	<u>AGTCATTGCC</u>	.....
#OeUP-35-NocelaraDelBelice-225		
#OeUP-36-EST-IstrskaBelica	<u>TGCTTCTCA</u> TTTTCACCAC CAAAATGTTT CTTCCACTTA TTTTCTCCAT TGAGTCGATC AAC #OeUP-36-SantaCaterina-148bp	AATCTTA
#OeUP-36-EST-IstrskaBelica	<u>CGTTTAACA</u> TGATCCTCGT AACACT <b>GTCG TCGTCGTCGT CGTCGT</b> CATG GTGTTGGTGC <u>TGATGATGGT</u>	..... .....
#OeUP-36-EST-IstrskaBelica	<u>GGTGCAGTCT</u>	.....
#OeUP-36-SantaCaterina-148bp		
#OeUP-37-EST-IstrskaBelica	<u>AATGGCTGCG</u> AAATGAGAAG AGAGAGCATG GAAGAAGAAA TTGGCTCCGT GAAGGAGCAT CACA #OeUP-37-Arbequina-161bp	ACTCCC .....
#OeUP-37-EST-IstrskaBelica	<u>GTGCACCAA</u> GAAAGAACTC TACCACATT ATCTTT <b>TTCT TCTCTTCTTC TTC</b> -- <u>ACCA</u>	..... .....
#OeUP-37-EST-IstrskaBelica	<u>AGAACAAAAT</u> TGAAATCTT G	..... .
#OeUP-37-Arbequina-161bp		

Baruca Arbeiter A. Razvoj ... funkcijskih markerjev za genetske študije oljke (*Olea europaea* L.).

Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2017

---

#OeUP-38-EST-IstrskaBelica      AGAACCCACCT CAACCACCAA AA--ATAATG ATGAAACAAA AACAAATGATG AACCAAAGGC GAATGACAAT  
#OeUP-38-Cipressino-157bp      .....G .....T... .CC.CG.C. .C..C..CC. ..TGG.TGCA ..A.....AA .G.-..A...  
  
#OeUP-38-EST-IstrskaBelica      TCCTCTCAAA TAACCTCATG GACGCAACAA CCCGAAC**CATC ATCATCATCA TCATCATGAA ACACACCCAG**  
#OeUP-38-Cipressino-157bp      GTA...TGC. .GG.T....A AC.A.C.A.. .---.... .C.G.--.G C..G..CA.C ...-..A.A  
  
#OeUP-38-EST-IstrskaBelica      AATATCGCCA ACAACAGACG AC  
#OeUP-38-Cipressino-157bp      .....  
  
#OeUP-39-EST-IstrskaBelica      TCTCGGTTCC TTCCATTCCA TCTCGATTTC CATATTGTGC AAGAAGTTTG TTATACTCTT GTTCCTTGA  
#OeUP-39-Crnica-197bp      .....  
#OeUP-39-Grignan-199bp      .....  
  
#OeUP-39-EST-IstrskaBelica      CCTCAATTTC GACATAAAAG CCCCACGAAT CTTTTCTGA GGAAAAAACCA CGGTCAAAAT AATCAGCATG  
#OeUP-39-Crnica-197bp      .....  
#OeUP-39-Grignan-199bp      ..... T .....  
  
#OeUP-39-EST-IstrskaBelica      TACGCTTAGA GA--GAGAGA GAGAGAGAGA CGACCTTGTA TGTATTCTG TTTCGC  
#OeUP-39-Crnica-197bp      ..... --A.....  
#OeUP-39-Grignan-199bp      ..... AA.....  
  
#OeUP-40-EST-IstrskaBelica      TACCCAGTAG CTTAAATCTG TATCTGTTCT TCA**TCTTCTT CTTCTTCTTC TTCTTCAAT GTTAAAAC**TT  
#OeUP-40-Picholine-185bp      .....  
.....T.. ..... C..... .C.....  
  
#OeUP-40-EST-IstrskaBelica      AAGATTAAAGA AAGAGAGATT GATTACCTAA TTTTGCTTCT TCAATCTTCT TCTTCCTCTT TCAAAATATT  
#OeUP-40-Picholine-185bp      .....  
..... C  
  
#OeUP-40-EST-IstrskaBelica      GTGAATCGGA GTCCAGAGAT TGGAATAAAG CTGAAGAAAT CGCATCGTCG T  
#OeUP-40-Picholine-185bp      .....  
..... .

Baruca Arbeiter A. Razvoj ... funkcijskih markerjev za genetske študije oljke (*Olea europaea* L.).

Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2017

---

#OeUP-41-EST-IstrskaBelica      CGGTGACCC TTAGCCTGTA CGGCCTCAGA AGCTGAACAG GACCATCACC CCTCCGCCGC CG---CCACC  
#OeUP-41-Leccino-160bp            ..... .C..... ..... -..... ..... ..... .....  
#OeUP-41-Samo-163bp            ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... TGA .....

#OeUP-41-EST-IstrskaBelica      ACAACCTCCG GCGGCGGTGA GTGTAGCCCC **AAAGAAGAAG** **AAGAAGAAGA** **AGATGATAGC** ATTAAAGTAA  
#OeUP-41-Leccino-160bp            ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... -..... .....  
#OeUP-41-EST-IstrskaBelica      #OeUP-41-Samo-163bp      TTAGACACCT CCTCGAAGGCC TCTGAT  
#OeUP-41-Leccino-160bp            ..... ..... .....  
#OeUP-41-Samo-163bp            ..... .....  
  
#OeUP-42-EST-IstrskaBelica      CGATTTCAAA GGGAAATCGAA CCAAGGATCC TTTCACTTTT ACATCCTTGA GCTGCCTGCT CCTAGTTGGC  
#OeUP-42-Samo-171bp            ..... ..... ..... ..... ..... .....  
  
#OeUP-42-EST-IstrskaBelica      TTTTCTGTTT TGGAAAGACC **TCTGCTGCTG** **CTGCTGCTGC** **TGCTGCTTTC** TCCTTCTAAA TCATCACTTC  
#OeUP-42-Samo-171bp            ..... ..... ..... ..... ..... ..... -..... .....  
  
#OeUP-42-EST-IstrskaBelica      TTTTCTTTAT AATCTTTCA TGGTAAATTG CGGGT  
#OeUP-42-Samo-171bp            ..... ..... .....  
  
#OeUP-43-EST-IstrskaBelica      AAAATCAAAC ACAACTTGGC AATAAGTAAC TTTTACTTA CCTTTCAAAA TTGAGAAATT CAAGCCTAAT  
#OeUP-43-Cipressino-197bp        ..... ..... ..... ..... ..... .....  
  
#OeUP-43-EST-IstrskaBelica      AATGTAGACC ACTTAATTCC TAACACGTTG GCAAAAAATT TCTATTTTTC **TTCTTCTTCT** **TCTTCTTCCC**  
#OeUP-43-Cipressino-197bp        ..... ..... ..... ..... ..... ..... -..... T  
  
#OeUP-43-EST-IstrskaBelica      TTTTTCTTT TGTGTTGTTT TTTT-ACTAA ATTAAGGTAT TACAATGTGC ATTTTCAGAT TGGAAG  
#OeUP-43-Cipressino-197bp        ..... T ..... ..... ..... ..... .....  
.....

Baruca Arbeiter A. Razvoj ... funkcijskih markerjev za genetske študije oljke (*Olea europaea* L.).

Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2017

---

#OeUP-44-EST-IstrskaBelica	<u>TCAGGTTCTG</u> GCAAGGGATTC AGATTGA <b>GCT</b> <b>GCTGCTGCTG</b> <b>CTGCTGCTTC</b> CTTTTTTTGA GCACTAACAC
#OeUP-44-Itrana-152bp	.....
#OeUP-44-NocelaraDelbelice-149	.....
#OeUP-44-EST-IstrskaBelica	TGTAGAATTG AGTATGTTCT AATCATGCAT CGGAACCTTA CTAATGTAAA TTAAGGGTCA TAAAC <u>CAGAGC</u>
#OeUP-44-Itrana-152bp	.....
#OeUP-44-NocelaraDelbelice-149	..... A.T. ....
#OeUP-44-EST-IstrskaBelica	<u>AGCAGAAGGG</u> ATGAA
#OeUP-44-Itrana-152bp	.....
#OeUP-44-NocelaraDelbelice-149	.....
#OeUP-45-EST-IstrskaBelica	<u>GGCCAATCAA</u> TGAACCAGCA CAAGAAACTA CAACAATTTC TTTTGTGCT GCAAACACTG TTA <b>AAGAAGA</b>
#OeUP-45-Storta-163bp	.....
#OeUP-45-Coratina-157bp	.....
#OeUP-45-EST-IstrskaBelica	<b>AGAAGAAGAA</b> <b>GAAG</b> CAGAAC ACAAAATCAC TGCTGGGATT TCCAACAAAG AAGAAATTAT CCCGGATTTG
#OeUP-45-Storta-163bp	.....
#OeUP-45-Coratina-157bp	..... .G.....GA .....C. ....GC.GGGA ..T.C.....
#OeUP-45-EST-IstrskaBelica	AATCTTGAGC TTAGAATCAA GCCCT
#OeUP-45-Storta-163bp	.....
#OeUP-45-Coratina-157bp	..... G. ....
#OeUP-46-EST-IstrskaBelica	<u>TCTTCCTGGT</u> ATTTGTTCG GTATTATGT ACATATATT GTGTGTGTAT TTCTATATTA CTATACAATA
#OeUP-46-Cipressino-204bp	.....
#OeUP-46-EST-IstrskaBelica	GATATGTGTT TGTGGAGAAC ATGTGCTTAT ATGTCATGAT TATTCGATTC TTAGATCTT GCCCTGGAAG
#OeUP-46-Cipressino-204bp	.....
#OeUP-46-EST-IstrskaBelica	CACGTATAGG GAA <b>ATAATA</b> <b>ATAATAATAA</b> <b>TAAT</b> ATTCA CTTGTGTGGC ATATATACTC TTGT
#OeUP-46-Cipressino-204bp	.....

## PRILOGA B

**Tabela genotipizacije z markerji EST-SSR za 24 sort oljk**

Sorta/lokus	OeUP-01	OeUP-01	OeUP-02	OeUP-02	OeUP-03	OeUP-03	OeUP-04	OeUP-04	OeUP-05	OeUP-05	OeUP-06	OeUP-06	OeUP-07	OeUP-07
<b>Arbequina</b>	200	221	204	207	168	170	217	226	189	189	141	163	211	211
<b>Ascolana tenera1</b>	203	206	204	212	168	170	205	232	186	189	144	159	209	209
<b>Ascolana tenera2</b>	203	206	204	212	168	170	205	232	186	189	144	159	209	209
<b>Ascolana tenera3</b>	203	206	204	212	168	170	205	232	186	189	144	159	209	209
<b>Ascolana tenera4</b>	203	206	204	212	168	170	205	232	186	189	144	159	209	209
<b>Ascolana tenera5</b>	203	206	204	212	168	170	205	232	186	189	144	159	209	209
<b>Ascolana tenera6</b>	203	206	204	212	168	170	205	232	186	189	144	159	209	209
<b>Athena</b>	200	203	204	207	168	170	217	232	189	189	150	159	228	228
<b>Itrska belica</b>	203	221	204	255	168	170	196	205	186	201	150	156	209	235
<b>Buga</b>	203	206	197	212	168	170	205	211	189	201	150	159	209	209
<b>Cipressino</b>	200	208	207	212	166	168	217	232	189	189	141	150	209	235
<b>Coratina</b>	200	206	204	210	168	170	205	214	186	192	141	150	209	209
<b>Črnica</b>	200	214	204	255	168	170	205	232	186	189	141	144	211	233
<b>Frantoio</b>	200	203	204	207	168	170	214	232	189	192	141	150	209	228
<b>Grignan</b>	206	214	197	212	168	170	205	205	186	201	150	159	209	209
<b>Itrana</b>	208	221	207	212	168	170	211	217	189	189	144	150	209	209
<b>Leccino</b>	200	200	204	207	168	170	211	232	189	189	150	159	228	228
<b>Leccio del corno</b>	200	203	212	212	168	170	211	214	189	192	141	159	228	228
<b>Leccione</b>	203	208	207	212	168	170	211	214	189	192	150	159	209	209
<b>Maurino</b>	200	203	207	207	168	170	211	232	189	189	141	159	209	209
<b>Moraiolo</b>	203	203	204	207	166	168	217	226	189	189	141	163	235	235

Baruca Arbeiter A. Razvoj ... funkcijskih markerjev za genetske študije oljke (*Olea europaea* L.).

Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2017

<b>Nocelara del Belice</b>	203	206	204	212	168	170	211	232	189	189	150	159	209	209
<b>Pendolino</b>	200	203	204	212	168	170	214	217	189	192	141	159	228	228
<b>Picholine</b>	200	206	204	212	168	170	211	217	189	189	144	144	207	213
<b>Samo</b>	208	214	204	212	168	170	205	205	186	201	144	150	209	209
<b>Oblica</b>	208	214	212	212	168	170	205	205	186	201	144	159	209	209
<b>Santa Caterina1</b>	208	208	212	212	168	168	205	211	186	189	144	159	213	213
<b>Santa Caterina 2</b>	208	208	212	212	168	168	205	211	186	189	144	159	213	213
<b>Santa Caterina 3</b>	208	208	212	212	168	168	205	211	186	189	144	159	213	213
<b>Santa Caterina 4</b>	208	208	212	212	168	168	205	211	186	189	144	159	213	213
<b>Santa Caterina 5</b>	208	208	212	212	168	168	205	211	186	189	144	159	213	213
<b>Santa Caterina 6</b>	208	208	212	212	168	168	205	211	186	189	144	159	213	213
<b>Štorta</b>	208	214	204	255	168	170	205	232	189	201	141	159	228	228
<b>Zelenjak</b>	200	200	204	207	166	168	217	232	189	189	150	159	228	228

Vzorec/lokus	OeUP-08	OeUP-08	OeUP-09	OeUP-09	OeUP-10	OeUP-10	OeUP-11	OeUP-11	OeUP-12	OeUP-12	OeUP-13	OeUP-13	OeUP-14	OeUP-14
<b>Arbequina</b>	196	208	141	144	212	218	156	162	151	151	166	174	157	157
<b>Ascolana tenera1</b>	196	196	150	156	212	218	159	165	151	151	162	166	157	165
<b>Ascolana tenera2</b>	196	196	150	156	212	218	159	165	151	151	162	166	157	165
<b>Ascolana tenera3</b>	196	196	150	156	212	218	159	165	151	151	162	166	157	165
<b>Ascolana tenera4</b>	196	196	150	156	212	218	159	165	151	151	162	166	157	165
<b>Ascolana tenera5</b>	196	196	150	156	212	218	159	165	151	151	162	166	157	165
<b>Ascolana tenera6</b>	196	196	150	156	212	218	159	165	151	151	162	166	157	165
<b>Athena</b>	202	208	144	154	212	218	149	162	151	151	166	166	153	163
<b>Itrska belica</b>	196	208	141	154	212	218	149	159	151	151	162	174	153	157
<b>Buga</b>	196	199	150	156	212	218	159	162	151	151	162	162	157	165

Baruca Arbeiter A. Razvoj ... funkcijskih markerjev za genetske študije oljke (*Olea europaea* L.).

Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2017

<b>Cipressino</b>	196	196	141	144	212	212	137	149	151	151	162	162	157	157
<b>Coratina</b>	196	208	141	156	218	218	159	162	140	151	162	166	153	153
<b>Črnica</b>	199	208	141	154	218	218	159	162	151	151	162	166	153	153
<b>Frantoio</b>	196	208	141	144	212	218	149	162	151	151	162	174	153	157
<b>Grignan</b>	196	196	150	156	212	212	159	165	151	151	162	162	163	165
<b>Itrana</b>	196	196	144	156	212	212	156	159	151	151	162	174	153	153
<b>Leccino</b>	202	208	141	154	218	218	159	162	151	151	162	174	153	157
<b>Leccio del corno</b>	196	202	141	141	212	212	162	162	151	151	162	174	153	163
<b>Leccione</b>	196	196	141	144	212	218	159	162	151	151	166	166	153	153
<b>Maurino</b>	196	202	144	154	212	218	159	162	151	151	166	174	153	153
<b>Moraiolo</b>	196	202	141	150	212	212	162	162	151	151	162	174	153	153
<b>Nocelara del Belice</b>	196	196	144	154	212	212	156	159	151	151	162	162	157	157
<b>Pendolino</b>	202	208	141	154	212	218	162	162	151	151	166	174	153	153
<b>Picholine</b>	196	199	141	154	212	218	159	162	151	151	162	162	165	165
<b>Samo</b>	196	199	150	154	212	218	159	162	151	151	162	166	157	165
<b>Oblica</b>	196	199	150	154	212	218	159	165	151	151	162	162	157	157
<b>Santa Caterina 1</b>	196	196	154	156	212	218	146	159	151	151	162	174	157	163
<b>Santa Caterina 2</b>	196	196	154	156	212	218	146	159	151	151	162	174	157	163
<b>Santa Caterina 3</b>	196	196	154	156	212	218	146	159	151	151	162	174	157	163
<b>Santa Caterina 4</b>	196	196	154	156	212	218	146	159	151	151	162	174	157	163
<b>Santa Caterina 5</b>	196	196	154	156	212	218	146	159	151	151	162	174	157	163
<b>Santa Caterina 6</b>	196	196	154	156	212	218	146	159	151	151	162	174	157	163
<b>Štorta</b>	196	208	141	156	212	218	159	162	151	151	162	166	153	165
<b>Zelenjak</b>	196	202	141	154	218	218	159	162	151	151	166	174	153	157

Baruca Arbeiter A. Razvoj ... funkcijskih markerjev za genetske študije oljke (*Olea europaea* L.).

Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2017

Vzorec/lokus	OeUP-15	OeUP-15	OeUP-16	OeUP-16	OeUP-17	OeUP-17	OeUP-18	OeUP-18	OeUP-19	OeUP-19	OeUP-20	OeUP-20	OeUP-21	OeUP-21
<b>Arbequina</b>	184	184	242	256	158	167	189	200	175	181	206	209	198	200
<b>Ascolana tenera1</b>	190	190	242	258	158	158	189	200	175	183	209	212	198	198
<b>Ascolana tenera2</b>	190	190	242	258	158	158	189	200	175	183	209	212	198	198
<b>Ascolana tenera3</b>	190	190	242	258	158	158	189	200	175	183	209	212	198	198
<b>Ascolana tenera4</b>	190	190	242	258	158	158	189	200	175	183	209	212	198	198
<b>Ascolana tenera5</b>	190	190	242	258	158	158	189	200	175	183	209	212	198	198
<b>Ascolana tenera6</b>	190	190	242	258	158	158	189	200	175	183	209	212	198	198
<b>Athena</b>	190	190	234	246	158	158	177	200	175	177	191	206	190	200
<b>Itrska belica</b>	190	190	242	252	158	167	177	194	175	177	209	212	198	205
<b>Buga</b>	184	190	242	258	158	158	177	200	177	183	212	212	198	198
<b>Cipressino</b>	184	187	242	258	158	158	189	189	175	177	209	212	198	205
<b>Coratina</b>	190	190	246	258	158	158	177	189	175	175	206	209	198	200
<b>Črnica</b>	184	184	246	258	158	158	177	177	175	183	206	212	198	200
<b>Frantoi</b>	190	190	242	246	158	158	177	189	175	175	206	209	198	200
<b>Grignan</b>	184	190	234	242	158	158	189	194	175	177	197	212	198	198
<b>Itrana</b>	190	190	246	258	158	158	189	200	175	175	206	209	190	198
<b>Leccino</b>	190	190	242	246	158	158	177	200	175	181	206	206	190	200
<b>Leccio del corno</b>	190	190	234	246	158	167	189	200	175	181	206	209	190	200
<b>Leccione</b>	190	190	246	246	158	158	177	200	175	181	206	209	190	198
<b>Maurino</b>	190	190	242	246	158	158	189	200	175	181	206	209	190	198
<b>Moraiolo</b>	190	190	246	252	158	167	189	200	175	181	209	212	200	205
<b>Nocelara del Belice</b>	190	190	234	252	158	158	177	200	175	177	209	212	190	198
<b>Pendolino</b>	190	190	234	246	158	158	177	189	175	181	206	206	190	200
<b>Picholine</b>	190	190	234	256	158	158	189	200	175	177	194	209	190	200

Baruca Arbeiter A. Razvoj ... funkcijskih markerjev za genetske študije oljke (*Olea europaea* L.).

Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2017

<b>Samo</b>	184	190	246	258	158	158	177	194	177	183	194	209	198	198
<b>Oblica</b>	184	190	246	258	158	158	189	194	175	177	197	212	190	198
<b>Santa Caterina1</b>	190	190	234	258	158	158	194	200	175	177	209	212	190	198
<b>Santa Caterina 2</b>	190	190	234	258	158	158	194	200	175	177	209	212	190	198
<b>Santa Caterina 3</b>	190	190	234	258	158	158	194	200	175	177	209	212	190	198
<b>Santa Caterina 4</b>	190	190	234	258	158	158	194	200	175	177	209	212	190	198
<b>Santa Caterina 5</b>	190	190	234	258	158	158	194	200	175	177	209	212	190	198
<b>Santa Caterina 6</b>	190	190	234	258	158	158	194	200	175	177	209	212	190	198
<b>Štorta</b>	187	187	246	258	158	158	177	177	175	183	209	212	200	200
<b>Zelenjak</b>	190	190	242	246	158	158	177	200	175	177	206	209	190	200

Vzorec/lokus	OeUP-22	OeUP-22	OeUP-23	OeUP-23	OeUP-24	OeUP-24	OeUP-25	OeUP-25	OeUP-26	OeUP-26	OeUP-27	OeUP-27	OeUP-28	OeUP-28
<b>Arbequina</b>	159	167	197	197	188	197	171	171	177	189	172	181	163	163
<b>Ascolana tenera1</b>	161	176	197	197	185	191	178	178	189	204	172	181	163	163
<b>Ascolana tenera2</b>	161	176	197	197	185	191	178	178	189	204	172	181	163	163
<b>Ascolana tenera3</b>	161	176	197	197	185	191	178	178	189	204	172	181	163	163
<b>Ascolana tenera4</b>	161	176	197	197	185	191	178	178	189	204	172	181	163	163
<b>Ascolana tenera5</b>	161	176	197	197	185	191	178	178	189	204	172	181	163	163
<b>Ascolana tenera6</b>	161	176	197	197	185	191	178	178	189	204	172	181	163	163
<b>Athena</b>	153	176	197	197	188	194	178	178	186	189	163	172	157	163
<b>Itrska belica</b>	157	184	197	197	185	191	178	178	186	189	172	181	152	163
<b>Buga</b>	161	184	197	197	185	191	171	171	186	186	172	181	163	163
<b>Cipressino</b>	157	161	194	197	185	200	171	171	186	204	172	181	163	163
<b>Coratina</b>	157	157	197	197	188	191	178	178	177	189	172	181	163	163

Baruca Arbeiter A. Razvoj ... funkcijskih markerjev za genetske študije oljke (*Olea europaea* L.).

Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2017

<b>Črnica</b>	171	184	197	197	188	191	171	178	186	189	163	172	163	163	163
<b>Frantoio</b>	153	171	197	197	188	197	171	178	189	189	163	181	163	163	163
<b>Grignan</b>	167	184	194	197	191	197	178	178	189	204	172	181	163	163	163
<b>Itrana</b>	167	184	194	197	188	191	171	178	186	189	172	181	157	163	163
<b>Leccino</b>	153	176	197	197	188	191	171	171	186	189	163	172	157	163	163
<b>Leccio del corno</b>	153	157	194	197	194	197	171	171	186	189	163	181	157	163	163
<b>Leccione</b>	153	176	194	197	191	197	178	178	186	189	172	181	157	163	163
<b>Maurino</b>	153	176	194	197	194	197	171	171	186	189	172	181	163	163	163
<b>Moraiolo</b>	157	171	194	197	194	200	171	171	189	195	172	181	176	184	184
<b>Nocelara del Belice</b>	167	176	194	197	191	197	171	171	186	189	172	181	176	176	176
<b>Pendolino</b>	157	171	194	197	188	191	171	171	177	189	163	172	163	163	163
<b>Picholine</b>	171	184	197	197	188	191	171	171	186	186	159	172	157	157	157
<b>Samo</b>	167	176	197	197	185	191	178	178	186	189	172	181	163	163	163
<b>Oblica</b>	161	184	197	197	191	197	171	171	189	204	172	181	157	163	163
<b>Santa Caterina 1</b>	176	184	194	197	191	191	171	171	186	204	172	172	157	157	157
<b>Santa Caterina 2</b>	176	184	194	197	191	191	171	171	186	204	172	172	157	157	157
<b>Santa Caterina 3</b>	176	184	194	197	191	191	171	171	186	204	172	172	157	157	157
<b>Santa Caterina 4</b>	176	184	194	197	191	191	171	171	186	204	172	172	157	157	157
<b>Santa Caterina 5</b>	176	184	194	197	191	191	171	171	186	204	172	172	157	157	157
<b>Santa Caterina 6</b>	176	184	194	197	191	191	171	171	186	204	172	172	157	157	157
<b>Štorta</b>	176	184	194	197	185	191	178	178	186	189	163	166	163	163	163
<b>Zelenjak</b>	171	176	194	197	188	191	171	171	186	189	163	172	163	163	163

Baruca Arbeiter A. Razvoj ... funkcijskih markerjev za genetske študije oljke (*Olea europaea* L.).

Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2017

Vzorec/lokus	OeUP-29	OeUP-29	OeUP-30	OeUP-30	OeUP-31	OeUP-31	OeUP-32	OeUP-32	OeUP-33	OeUP-33	OeUP-34	OeUP-34	OeUP-35	OeUP-35
<b>Arbequina</b>	209	211	190	192	206	206	174	174	226	226	201	217	225	231
<b>Ascolana tenera1</b>	205	209	192	196	206	212	171	188	226	226	211	213	225	225
<b>Ascolana tenera2</b>	205	209	192	196	206	212	171	188	226	226	211	213	225	225
<b>Ascolana tenera3</b>	205	209	192	196	206	212	171	188	226	226	211	213	225	225
<b>Ascolana tenera4</b>	205	209	192	196	206	212	171	188	226	226	211	213	225	225
<b>Ascolana tenera5</b>	205	209	192	196	206	212	171	188	226	226	211	213	225	225
<b>Ascolana tenera6</b>	205	209	192	196	206	212	171	188	226	226	211	213	225	225
<b>Athena</b>	211	215	190	192	206	209	171	174	226	226	213	220	225	228
<b>Itrska belica</b>	209	211	190	196	209	212	174	188	220	220	201	217	225	225
<b>Buga</b>	209	211	192	192	206	212	171	171	226	226	211	217	225	228
<b>Cipressino</b>	209	211	190	192	203	206	174	188	220	220	217	217	225	225
<b>Coratina</b>	209	215	190	192	206	212	174	174	228	228	211	224	225	228
<b>Črnica</b>	209	211	190	196	206	206	174	188	228	228	213	220	225	225
<b>Frantoio</b>	209	215	190	190	206	206	174	174	220	220	213	224	225	225
<b>Grignan</b>	209	211	192	192	206	206	171	188	226	226	211	213	225	228
<b>Itrana</b>	209	211	190	192	206	206	171	174	220	226	211	224	225	225
<b>Leccino</b>	211	215	190	192	206	206	171	174	226	226	213	220	225	228
<b>Leccio del corno</b>	209	211	190	192	206	206	174	174	226	226	193	226	225	225
<b>Leccione</b>	209	211	190	192	206	206	174	174	220	226	193	224	225	228
<b>Maurino</b>	211	215	190	192	206	206	171	174	220	226	193	213	225	228
<b>Moraiolo</b>	211	211	192	196	206	209	174	174	226	234	201	224	225	225
<b>Nocelara del Belice</b>	209	209	192	196	206	206	171	174	226	226	217	220	225	225
<b>Pendolino</b>	211	215	190	192	206	206	174	174	226	226	193	224	225	228
<b>Picholine</b>	209	211	192	192	206	209	171	174	226	226	211	213	225	225

Baruca Arbeiter A. Razvoj ... funkcijskih markerjev za genetske študije oljke (*Olea europaea* L.).

Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2017

<b>Samo</b>	209	211	190	192	206	212	171	188	226	226	213	220	225	228
<b>Oblica</b>	205	209	190	192	206	206	171	174	226	226	213	220	225	225
<b>Santa Caterina 1</b>	209	211	192	196	206	212	171	188	226	226	211	220	225	228
<b>Santa Caterina 2</b>	209	211	192	196	206	212	171	188	226	226	211	220	225	228
<b>Santa Caterina 3</b>	209	211	192	196	206	212	171	188	226	226	211	220	225	228
<b>Santa Caterina 4</b>	209	211	192	196	206	212	171	188	226	226	211	220	225	228
<b>Santa Caterina 5</b>	209	211	192	196	206	212	171	188	226	226	211	220	225	228
<b>Santa Caterina 6</b>	209	211	192	196	206	212	171	188	226	226	211	220	225	228
<b>Štorta</b>	209	211	190	190	206	206	174	188	228	228	211	213	225	228
<b>Zelenjak</b>	211	215	190	192	206	206	174	174	226	226	193	213	225	228

Vzorec/lokus	OeUP-36	OeUP-36	OeUP-37	OeUP-37	OeUP-38	OeUP-38	OeUP-39	OeUP-39	OeUP-40	OeUP-40	OeUP-41	OeUP-41	OeUP-42	OeUP-42
<b>Arbequina</b>	148	148	161	161	157	157	197	199	179	197	163	163	171	177
<b>Ascolana tenera 1</b>	148	148	148	155	157	167	197	199	179	191	160	163	162	174
<b>Ascolana tenera 2</b>	148	148	148	155	157	167	197	199	179	191	160	163	162	174
<b>Ascolana tenera 3</b>	148	148	148	155	157	167	197	199	179	191	160	163	162	174
<b>Ascolana tenera 4</b>	148	148	148	155	157	167	197	199	179	191	160	163	162	174
<b>Ascolana tenera 5</b>	148	148	148	155	157	167	197	199	179	191	160	163	162	174
<b>Ascolana tenera 6</b>	148	148	148	155	157	167	197	199	179	191	160	163	162	174
<b>Athena</b>	142	148	161	188	150	150	197	209	179	197	163	163	171	171
<b>Itrska belica</b>	148	154	155	164	157	167	193	197	185	191	160	160	162	177
<b>Buga</b>	148	148	148	164	167	167	199	199	191	191	160	163	171	174
<b>Cipressino</b>	148	148	148	161	157	157	199	205	185	191	160	163	168	174
<b>Coratina</b>	148	148	148	161	157	167	197	209	191	197	160	160	171	174

Baruca Arbeiter A. Razvoj ... funkcijskih markerjev za genetske študije oljke (*Olea europaea* L.).

Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2017

<b>Črnica</b>	148	154	148	161	167	167	197	197	185	191	160	160	171	171
<b>Frantoio</b>	148	154	155	161	157	157	197	209	179	191	160	160	171	171
<b>Grignan</b>	148	148	164	185	157	167	199	199	191	191	160	163	162	174
<b>Itrana</b>	148	148	164	185	157	167	199	209	185	185	160	160	162	174
<b>Leccino</b>	148	148	161	188	157	167	195	209	191	191	160	160	171	171
<b>Leccio del corno</b>	148	148	158	161	157	167	195	209	191	197	163	163	171	171
<b>Leccione</b>	148	148	155	158	152	152	197	209	179	191	160	163	171	171
<b>Maurino</b>	148	148	155	158	152	162	197	209	191	191	160	163	171	171
<b>Moraiolo</b>	148	154	155	164	157	167	197	209	185	191	163	163	171	171
<b>Nocelara del Belice</b>	148	148	148	164	152	167	197	199	185	191	160	163	162	171
<b>Pendolino</b>	148	154	158	161	157	167	195	209	191	191	160	160	171	171
<b>Picholine</b>	148	148	161	185	157	167	197	199	185	185	163	163	171	183
<b>Samo</b>	148	148	148	155	157	167	199	199	179	185	163	163	171	171
<b>Oblica</b>	148	148	148	155	157	167	197	199	179	191	163	163	171	174
<b>Santa Caterina 1</b>	148	148	148	188	167	167	197	199	185	191	163	163	162	171
<b>Santa Caterina 2</b>	148	148	148	188	167	167	197	199	185	191	163	163	162	171
<b>Santa Caterina 3</b>	148	148	148	188	167	167	197	199	185	191	163	163	162	171
<b>Santa Caterina 4</b>	148	148	148	188	167	167	197	199	185	191	163	163	162	171
<b>Santa Caterina 5</b>	148	148	148	188	167	167	197	199	185	191	163	163	162	171
<b>Santa Caterina 6</b>	148	148	148	188	167	167	197	199	185	191	163	163	162	171
<b>Štorta</b>	148	148	161	188	157	167	197	199	179	191	163	163	162	171
<b>Zelenjak</b>	142	148	155	188	157	167	197	209	191	191	160	160	171	171

Baruca Arbeiter A. Razvoj ... funkcijskih markerjev za genetske študije oljke (*Olea europaea* L.).

Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2017

---

Vzorec/lokus	OeUP-43	OeUP-43	OeUP-44	OeUP-44	OeUP-45	OeUP-45	OeUP-46	OeUP-46
<b>Arbequina</b>	205	205	149	149	154	157	204	204
<b>Ascolana tenera1</b>	205	205	152	152	163	168	201	204
<b>Ascolana tenera2</b>	205	205	152	152	163	168	201	204
<b>Ascolana tenera3</b>	205	205	152	152	163	168	201	204
<b>Ascolana tenera4</b>	205	205	152	152	163	168	201	204
<b>Ascolana tenera5</b>	205	205	152	152	163	168	201	204
<b>Ascolana tenera6</b>	205	205	152	152	163	168	201	204
<b>Athena</b>	205	205	149	152	157	163	201	204
<b>Itrska belica</b>	205	205	149	155	154	163	204	204
<b>Buga</b>	205	205	152	152	163	168	201	204
<b>Cipressino</b>	197	197	149	152	157	163	204	204
<b>Coratina</b>	205	205	152	152	157	157	204	204
<b>Črnica</b>	205	205	152	152	157	163	204	204
<b>Frantoio</b>	205	205	149	152	157	163	204	204
<b>Grignan</b>	205	205	149	152	163	168	204	204
<b>Itrana</b>	205	205	152	152	154	163	204	204
<b>Leccino</b>	231	231	149	152	157	157	201	204
<b>Leccio del corno</b>	205	205	149	152	157	163	201	204
<b>Leccione</b>	205	205	152	152	151	163	201	204
<b>Maurino</b>	205	205	149	152	157	163	201	204
<b>Moraiolo</b>	195	231	149	152	151	163	201	204
<b>Nocelara del Belice</b>	205	205	149	149	163	168	204	204
<b>Pendolino</b>	205	205	149	152	157	163	201	204
<b>Picholine</b>	205	205	149	152	157	168	201	204

Baruca Arbeiter A. Razvoj ... funkcijskih markerjev za genetske študije oljke (*Olea europaea* L.).

Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2017

---

<b>Samo</b>	205	205	152	152	151	163	201	204
<b>Oblica</b>	205	205	149	152	151	163	201	204
<b>Santa Caterina 1</b>	205	205	149	152	163	168	201	204
<b>Santa Caterina 2</b>	205	205	149	152	163	168	201	204
<b>Santa Caterina 3</b>	205	205	149	152	163	168	201	204
<b>Santa Caterina 4</b>	205	205	149	152	163	168	201	204
<b>Santa Caterina 5</b>	205	205	149	152	163	168	201	204
<b>Santa Caterina 6</b>	205	205	149	152	163	168	201	204
<b>Štorta</b>	205	205	152	152	163	163	201	204
<b>Zelenjak</b>	231	231	149	152	145	157	201	204

Baruca Arbeiter A. Razvoj ... funkcijskih markerjev za genetske študije oljke (*Olea europaea* L.).

Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2017

## PRILOGA C

**Tabela genotipizacije z genomskimi markerji SSR za 24 sort oljk**

Vzorec/lokus	DCA9	DCA9	DCA16	DCA16	GAPU101	GAPU101	DCA11	DCA11	UDO99 019	UDO99 019	EMO3	EMO3	DCA3	DCA3	DCA5	DCA5
<b>Arbequina</b>	183	205	123	147	186	207	146	184	131	156	215	215	228	240	200	204
<b>Ascolana tenera1</b>	193	199	125	154	199	201	166	184	131	131	206	211	228	246	204	206
<b>Ascolana tenera2</b>	193	199	125	154	199	201	166	184	131	131	206	211	228	246	204	206
<b>Ascolana tenera3</b>	193	207	125	154	199	201	166	188	131	131	206	211	228	246	204	206
<b>Ascolana tenera4</b>	193	207	125	154	199	201	166	184	131	131	206	211	228	246	204	206
<b>Ascolana tenera5</b>	193	207	125	154	199	201	166	188	131	131	206	211	228	246	204	206
<b>Ascolana tenera6</b>	193	207	125	154	199	201	166	184	131	131	206	211	228	246	204	206
<b>Athena</b>	162	181	150	174	186	201	136	146	99	168	209	215	240	250	196	204
<b>Itrska belica</b>	193	193	125	172	194	218	146	166	99	131	213	215	236	246	204	206
<b>Buga</b>	193	205	150	174	192	218	146	182	131	145	206	211	236	246	204	206
<b>Cipressino</b>	162	186	150	165	194	207	131	146	131	145	211	215	238	240	200	204
<b>Coratina</b>	181	193	150	172	199	218	136	176	131	131	213	215	236	240	196	204
<b>Črnica</b>	181	193	156	174	186	192	136	146	131	168	215	215	234	250	196	204
<b>Frantoio</b>	181	205	150	156	186	199	136	184	131	168	215	215	234	240	196	204
<b>Grignan</b>	193	209	125	154	192	201	146	166	131	145	206	213	236	246	204	206
<b>Itrana</b>	181	193	123	125	186	201	152	184	131	168	213	215	236	246	196	204
<b>Leccino</b>	162	205	150	174	199	201	136	184	99	168	211	215	240	250	196	204
<b>Leccio del corno</b>	181	205	147	156	199	201	136	146	131	168	211	215	234	250	204	204
<b>Leccione</b>	162	181	150	150	192	197	136	184	131	168	211	215	240	240	204	204
<b>Maurino</b>	205	205	150	172	186	192	136	146	131	168	209	215	234	250	204	204

Baruca Arbeiter A. Razvoj ... funkcijskih markerjev za genetske študije oljke (*Olea europaea* L.).

Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2017

<b>Moriaolo</b>	183	205	150	150	194	207	146	180	131	131	215	219	228	240	204	204
<b>Nocelara del Belice</b>	162	172	150	174	201	207	152	184	131	131	211	215	240	246	204	204
<b>Pendolino</b>	162	205	150	172	199	201	146	180	99	168	211	215	240	250	204	204
<b>Picholine</b>	193	193	147	174	201	207	136	184	131	131	213	215	228	250	200	204
<b>Samo</b>	162	203	125	154	199	218	146	184	131	131	213	215	228	250	204	206
<b>Oblica</b>	162	203	150	174	192	218	166	184	131	145	211	215	236	250	204	206
<b>Santa Caterina1</b>	162	193	125	174	201	218	166	184	131	131	211	213	246	250	204	204
<b>Santa Caterina 2</b>	162	193	125	174	201	218	166	184	131	131	211	213	246	250	204	204
<b>Santa Caterina 3</b>	162	193	125	174	201	218	166	184	131	131	211	213	246	250	204	204
<b>Santa Caterina 4</b>	162	193	125	174	201	218	166	184	131	131	211	213	246	250	204	204
<b>Santa Caterina 5</b>	162	193	125	174	201	218	166	188	131	131	211	213	246	250	204	204
<b>Santa Caterina 6</b>	162	193	125	174	201	218	166	184	131	131	211	213	246	250	204	204
<b>Štorta</b>	193	203	125	156	186	201	146	184	131	145	215	215	234	246	204	204
<b>Zelenjak</b>	162	205	147	156	186	201	146	184	99	131	209	215	240	250	204	204

Vzorec/lokus	DCA7	DCA7	DCA14	DCA14	DCA15	DCA15	DCA18	DCA18	GAPU71B	GAPU71B	GAPU103A	GAPU103A	EMO90	EMO90
<b>Arbequina</b>	146	146	192	192	243	263	169	179	124	144	136	160	186	192
<b>Ascolana tenera1</b>	166	166	182	192	243	263	173	177	124	144	136	160	186	188
<b>Ascolana tenera2</b>	166	166	182	192	243	263	173	177	124	144	136	160	186	188
<b>Ascolana tenera3</b>	166	166	182	192	243	263	165	173	124	144	136	160	186	188
<b>Ascolana tenera4</b>	166	166	182	192	243	263	165	173	124	144	136	160	186	188
<b>Ascolana tenera5</b>	166	166	182	192	243	263	165	173	124	144	136	160	186	188
<b>Ascolana tenera6</b>	166	166	182	192	243	263	165	173	124	144	136	160	186	188
<b>Athena</b>	143	149	175	184	243	254	177	179	144	144	136	163	186	186

Baruca Arbeiter A. Razvoj ... funkcijskih markerjev za genetske študije oljke (*Olea europaea* L.).

Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2017

<b>Itrska belica</b>	131	131	182	188	243	263	177	179	127	144	136	175	184	186
<b>Buga</b>	131	149	192	192	243	243	173	177	124	144	136	160	184	186
<b>Cipressino</b>	151	166	175	184	243	263	171	177	124	130	136	160	192	196
<b>Coratina</b>	139	151	184	192	243	243	177	181	124	144	136	163	186	192
<b>Črnica</b>	143	149	184	192	243	243	179	185	124	130	160	163	186	188
<b>Frantoio</b>	143	149	184	192	243	263	177	179	124	144	136	163	186	192
<b>Grignan</b>	149	166	182	192	243	263	173	177	120	130	136	160	186	188
<b>Itrana</b>	131	143	180	192	243	243	173	181	126	144	136	163	186	186
<b>Leccino</b>	143	149	182	184	254	263	177	177	124	144	136	160	186	192
<b>Leccio del corno</b>	143	149	175	184	243	254	177	179	124	144	136	160	186	192
<b>Leccione</b>	151	166	182	192	243	263	177	179	124	124	136	163	186	192
<b>Maurino</b>	151	151	175	184	254	263	177	177	144	144	136	163	186	186
<b>Moraiolo</b>	131	151	177	194	243	254	179	185	124	132	136	151	186	192
<b>Nocelara del Belice</b>	166	166	180	192	243	243	173	177	144	144	136	151	186	192
<b>Pendolino</b>	143	149	175	192	254	263	177	179	124	144	136	160	186	192
<b>Picholine</b>	151	166	192	192	243	263	171	181	124	144	136	151	186	192
<b>Samo</b>	149	166	188	192	243	263	177	185	120	124	136	160	186	188
<b>Oblica</b>	149	151	182	192	263	263	173	177	120	124	136	175	184	186
<b>Santa Caterina 1</b>	131	166	182	192	243	263	177	185	120	144	136	160	186	186
<b>Santa Caterina 2</b>	131	166	182	192	243	263	177	185	120	144	136	160	186	186
<b>Santa Caterina 3</b>	131	166	182	192	243	263	177	185	120	144	136	160	186	186
<b>Santa Caterina 4</b>	131	166	182	192	243	263	177	185	120	144	136	160	186	186
<b>Santa Caterina 5</b>	131	166	182	192	243	263	177	181	120	144	136	160	186	186
<b>Santa Caterina 6</b>	131	166	182	192	243	263	177	181	120	144	136	160	186	186
<b>Štorta</b>	143	149	182	192	243	243	177	179	124	130	163	175	186	188
<b>Zelenjak</b>	143	149	175	192	243	254	177	179	124	144	136	163	186	186



