

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Barbara PIPAN

**GENETSKA RAZNOLIKOST NAVADNE OGRŠČICE
(*Brassica napus* L.) IN NJENIH SPOLNO
KOMPATIBILNIH SORODNIKOV V SLOVENSKEM
PRIDELOVALNEM PROSTORU**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Barbara PIPAN

**GENETSKA RAZNOLIKOST NAVADNE OGRŠČICE (*Brassica napus*
L.) IN NJENIH SPOLNO KOMPATIBILNIH SORODNIKOV V
SLOVENSKEM PRIDELOVALNEM PROSTORU**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**GENETIC DIVERSITY OF RAPESEED (*Brassica napus* L.) AND ITS
SEXUALLY COMPATIBLE RELATIVES IN SLOVENIAN
PRODUCTION AREA**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2013

Z doktorsko disertacijo zaključujem podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje biotehnologija, na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani.

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa 20. seje Komisije za doktorski študij UL z dne 21. 9. 2011 (po pooblastilu Senata Univerze z dne 20. 1. 2009) je bilo potrjeno, da kandidat izpolnjuje pogoje za neposreden prehod na doktorski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje doktorata znanosti s področja biotehnologije in da se sprejme tema disertacije z naslovom Genetska raznolikost navadne ogrščice (*Brassica napus* L.) in njenih spolno kompatibilnih sorodnikov v slovenskem pridelovalnem prostoru. Za mentorja je bil imenovan izr. prof. dr. Vladimir Meglič.

Doktorska naloga je bila opravljena na Oddelku za poljedelstvo in semenarstvo Kmetijskega inštituta Slovenije in na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za oceno in zagovor:

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

Član: izr. prof. dr. Vladimir Meglič
Kmetijski inštitut Slovenije

Član: prof. dr. Marko Debeljak
Univerza v Novi Gorici, Fakulteta za znanosti o okolju

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Barbara Pipan

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	UDK 633.85:631.528:575 (043.3)=163.6
KG	genetska raznolikost/ <i>Brassica napus</i> /spolno kompatibilni sorodniki/pridelovalni prostor/navadna ogrščica/prenos genov/Slovenija/genotipizacija/mikrosatelitni markerji/samosevci/podivjane populacije
AV	PIPAN, Barbara, univ. dipl. inž. agr.
SA	MEGLIČ, Vladimir (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje biotehnologije
LI	2013
IN	GENETSKA RAZNOLIKOST NAVADNE OGRŠČICE (<i>Brassica napus</i> L.) IN NJENIH SPOLNO KOMPATIBILNIH SORODNIKOV V SLOVENSKEM PRIDELOVALNEM PROSTORU
TD	Doktorska disertacija
OP	XV, 157 str., 22 pregl., 41 sl., 8 pril., 263 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Analiza genetske raznolikosti vrste <i>Brassica napus</i> L. in njenih spolno kompatibilnih sorodnikov je bila zasnovana na podlagi časovne (štiri leta) in prostorske (celoten slovenski pridelovalni prostor) dimenzije z uporabo mikrosatelitnih markerjev. V analizo smo vključili referenčne sorte in oblike vrste <i>B. napus</i> ter njene spolno kompatibilne sorodnike, ki se pojavljajo v Sloveniji. Največ samosevnih in podivjanih populacij vrste <i>B. napus</i> smo zbrali znotraj regij, kjer se oljna ogrščica prideluje v največjem obsegu. Za slovenski pridelovalni prostor je značilna nepredvidljiva dinamika pojavljanja rastlin, ki vzklijejo iz semena, shranjenega v talni semenski banki. Izmed vseh spolno kompatibilnih sorodnikov vrste <i>B. napus</i> se v času cvetenja oljne ogrščice pojavljata le vrsti <i>B. rapa</i> in <i>S. arvensis</i>. Izrazite karakteristike samoohranjenih naravnih populacij imajo podivjane populacije vrste <i>B. napus</i>. Ugotovili smo tudi, da je izbrani set mikrosatelitnih markerjev ustrezen za ločevanje genotipov na nivoju istega rodu, vrste, podvrste in sorte znotraj družine Brassicaceae ter da izvor mikrosatelita ali njegova struktura ne vplivata na njegovo informacijsko vrednost. Samosevne in podivjane populacije so genetsko bolj raznolike kot referenčne sorte vrste <i>B. napus</i>, ki pa so manj raznolike od genskega sklada referenčnih sort spolno kompatibilnih sorodnikov. Časovno spremljanje prenosa genov znotraj samosevnih in podivjanih oblik vrst <i>B. napus</i>, <i>B. rapa</i> in <i>S. arvensis</i> dokazuje, da sta ustalitev in ohranjanje prenesenih genov v genome samoohranjenih rastlin prek spontanega intra- in interspeciestnih križanj v naravi možna. Izračunana stopnja tujeprašnosti, ki pomeni potencial za prenos genov prek spontanega križanja, je 8,8-odstotna. Koeficient genetske in geografske povezanosti genotipov s terena dokazuje, da se znotraj istega območja v Sloveniji pojavljajo genetsko bolj podobni genotipi, iz česar sledi, da se lahko med sabo oprašujejo in samoohranjajo iz generacije v generacijo, kar še posebej velja za populacije vrste <i>S. arvensis</i>. Genotipizacija vrste <i>B. napus</i> in njenih spolno kompatibilnih sorodnikov znotraj družine Brassicaceae je na podlagi kodominantne vhodne matrike na diploidnem nivoju ustrezna, saj omogoča tudi izračun ocene stopenj prenosa in ustalitve genov v naravi prek spontanega križanja. Rezultati analize prisotnosti gensko spremenjenih organizmov vrste <i>B. napus</i> na štirih presejalnih genskih elementih (bar, EPSPS, p35S in tNOS) so bili za vse analizirane vzorce negativni.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 633.85:631.528:575 (043.3)=163.6
CX genetic diversity/*Brassica napus*/sexually compatible relatives /production area/rapeseed/gene flow/Slovenia/genotyping/microsatellite markers/volunteers/feral populations
AU PIPAN, Barbara
AA MEGLIČ, Vladimir (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, Field: Biotechnology
PY 2013
TI GENETIC DIVERSITY OF RAPESEED (*Brassica napus* L.) AND ITS SEXUALLY COMPATIBLE RELATIVES IN SLOVENIAN PRODUCTION AREA
DT Doctoral Dissertation
NO XV, 157 p., 22 tab., 41 fig., 8 ann., 263 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Analysis of genetic diversity of the *Brassica napus* L. and its sexually compatible relatives (SKR) was performed on the basis of temporal (four years) and spatial (the entire Slovenian production space) level using microsatellite markers. We have included as well reference varieties and forms of *B. napus* and SKR, which appear in Slovenia. Most volunteer and feral populations of *B. napus* were collected within the regions with the highest oilseed rape production. The Slovenian production area is characterized by unpredictable dynamics of plants that appeared from soil seed bank. From all of the SKS appeared in Slovenia, only *B. rapa* and *S. arvensis* were found during the flowering period of oilseed rape. Prominent characteristics of self-recruited natural populations have feral population of *B. napus*. We have also found that the selected set of microsatellite markers is suitable for genetic differentiation of genotypes at the genus, species, subspecies and variety level within the Brassicaceae family and that the origin of microsatellites or its structure does not affect the polymorphic information content. Volunteer and feral populations are genetically more diverse than the reference varieties of *B. napus*, which are less diverse than gene pool of the reference varieties of SKR. Temporal monitoring of gene flow within volunteer and feral forms of *B. napus*, *B. rapa* and *S. arvensis* shows that the settlement and conservation of gene flow in those self-recruited genomes, via spontaneous intra-and inter-specific hybridizations in nature, is possible. The out-crossing rate, which reflects the potential for gene flow via spontaneous pollination, was 8.8 %. The coefficient of genetic and geographic uniformity of genotypes from the field survey shows, that within the same area in Slovenia appear genetically more similar genotypes, since they pollinated each other and were self-recruited from generation to generation, which is especially expressed in populations of *S. arvensis*. Genotyping of *B. napus* and its SKR within the family Brassicaceae, based on codominant input matrix on diploid level are appropriate, which allows the calculation of estimates of gene flow and the conservation of genes via spontaneous pollination in nature. The results of the analysis for the presence of GMOs for *B. napus* using four screening genetic elements (bar, EPSPS, P35S and tNOS) were negative for all samples.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	IX
Kazalo slik	XI
Kazalo prilog	XIII
Okrajšave in simboli	XIV
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 ZNAČILNOSTI VRSTE <i>B. napus</i>	4
2.1.1 Genetski izvor	4
2.1.2 Biološke značilnosti	5
2.1.3 Žlahtnjenje	6
2.1.3.1 Cilji žlahtnjenja	6
2.1.3.2 Žlahtniteljske metode	7
2.1.3.3 Pridobivanje hibridnega semena	9
2.1.4 Molekulska evolucija pri rodovih <i>Arabidopsis</i> in <i>Brassica</i> znotraj družine Brassicaceae	10
2.1.5 Transgene rastline	12
2.1.6 Ohranjanje semena v talni semenski banki	14
2.1.6.1 Dormantnost semena	14
2.1.6.2 Samoohranjanje semen v tleh	15
2.1.6.3 Dejavniki, ki vplivajo na kalivost semen vrste <i>B. napus</i> v tleh	17
2.1.6.4 Simulacijski modeli dinamike pojavljanja rastlin vrste <i>B. napus</i> iz talne semenske banke	18
2.1.7 Področja uporabnosti rastlin vrste <i>B. napus</i>	20
2.1.8 Razširjenost pridelave v Sloveniji in v svetu	21
2.2 SPOLNO KOMPATIBILNI SORODNIKI VRSTE <i>B. napus</i>	22
2.3 POTENCIAL ZA VERTIKALNI PRENOS GENOV	24
2.3.1 Intrasppeciesna križanja vrste <i>B. napus</i>	25
2.3.2 Interspeciesna križanja vrste <i>B. napus</i> znotraj družine Brassicaceae	26
2.3.2.1 <i>B. rapa</i>	28
2.3.2.2 <i>B. oleracea</i>	28
2.3.2.3 <i>R. raphanistrum</i>	29
2.3.2.4 <i>H. incana</i>	29
2.3.2.5 <i>S. arvensis</i>	30
2.3.2.6 <i>B. nigra</i>	30
2.3.2.7 <i>R. sativus</i>	30
2.3.2.8 <i>D. muralis</i> , <i>D. tenuifolia</i> in <i>R. rugosum</i>	30

2.4	POTENCIAL ZA HORIZONTALNI PRENOS GENOV ZNOTRAJ DRUŽINE BRASSICACEAE IN MED PROKARIONTI	30
2.5	KARAKTERIZACIJA GENETSKE RAZNOLIKOSTI NA MOLEKULARNEM NIVOJU	32
2.5.1	Uporaba molekulskih markerjev v genetskih analizah znotraj družine Brassicaceae	33
2.5.2	Uporaba mikrosatelitnih markerjev za analizo genetske raznolikosti vrste <i>B. napus</i> in njenih spolno kompatibilnih sorodnikov	35
3	MATERIAL IN METODE	38
3.1	ANALIZA GENETSKE RAZNOLIKOSTI	38
3.1.1	Prostorska identifikacija lokacij in terensko vzorčenje	38
3.1.2	Pridobivanje in vzgoja referenčnega materiala	41
3.1.3	Priprava vzorcev rastlinskega materiala za izolacijo DNA	46
3.1.4	Izolacija celokupne DNA	46
3.1.5	Merjenje koncentracije DNA	47
3.1.6	Analiza mikrosatelitnih markerjev	47
3.1.6.1	Izbor mikrosatelitnih markerjev	47
3.1.6.2	Fluorescentno označevanje začetnih oligonukleotidov	50
3.1.6.3	PCR-analiza	51
3.1.6.4	Fragmentna analiza	53
3.2	VREDNOTENJE GENETSKE RAZNOLIKOSTI IN STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV	54
3.2.1	Obdelava rezultatov na diploidnem nivoju	54
3.2.1.1	Vrednotenje uporabljenih mikrosatelitnih markerjev za analizo genetske raznolikosti in izračuni F-statistike	54
3.2.1.2	Stopnja genetske raznolikosti in populacijska statistika	55
3.2.1.3	Genetska razdalja in struktura populacij	57
3.2.1.4	Vrednotenje inter- in intraspeciesnih križanj ter prenosa genov v prostoru in času	58
3.2.2	Obdelava rezultatov na tetraploidnem nivoju	61
3.2.2.1	Stopnja genetske raznolikosti	61
3.2.2.2	Genetska razdalja in struktura populacij	62
3.2.2.3	Vrednotenje inter- in intraspeciesnih križanj ter prenosa genov	63
3.2.3	Primerjava prikaza in obdelave rezultatov med diploidnim in tetraploidnim nivojem	63
3.3	ANALIZA PRISOTNOSTI GENSKO SPREMENJENIH ORGANIZMOV VRSTE <i>B. napus</i> V SLOVENIJI	64
3.3.1.	Pridobivanje rastlinskega materiala	64
3.3.2	Referenčni material	65
3.3.3	Priprava vzorcev in izolacija celokupne DNA	66
3.3.4	Merjenje koncentracije DNA	66
3.3.5	Kvalitativna PCR-analiza za določitev gensko spremenjenih organizmov vrste <i>B. napus</i>	67
3.3.6	Določitev gensko spremenjenih organizmov vrste <i>B. napus</i> z uporabo Q-PCR-analize	68
4	REZULTATI	71

4.1	ANALIZA GENETSKE RAZNOLIKOSTI NA DIPLOIDNEM NIVOJU	71
4.1.1	Genotipi, vključeni v analizo genetske raznolikosti	71
4.1.1.1	Genotipi vrste <i>B. napus</i>	71
4.1.1.2	Genotipi spolno kompatibilnih sorodnikov	72
4.1.2	Genetska povezanost pridelovalnih (referenčnih) genotipov vrste <i>B. napus</i> v Sloveniji	73
4.1.3	Genetska struktura samosevnih populacij vrste <i>B. napus</i> v Sloveniji	78
4.1.3.1	Genetska primerjava samosevnih populacij z referenčnimi genotipi sort vrste <i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i> z uporabo petinštiridesetih markerjev	79
4.1.3.2	Genetska primerjava samosevnih populacij z referenčnimi genotipi sort vrste <i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i> in subsp. <i>napobrassica</i> ter z referenčnimi genotipi spolno kompatibilnih sorodnikov z uporabo petnajstih markerjev	80
4.1.4	Izvor, genetska struktura in prostorska povezanost podivjanih populacij vrste <i>B. napus</i> v Sloveniji	81
4.1.4.1	Genetska primerjava podivjanih populacij z referenčnimi genotipi sort vrste <i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i> z uporabo petinštiridesetih markerjev	81
4.1.4.2	Prostorska in genetska povezanost genotipov podivjanih populacij iz celotne Slovenije v štiriletnem časovnem obdobju z uporabo petinštiridesetih markerjev	84
4.1.5	Prostorsko vrednotenje in identifikacija prenosa genov znotraj vrste <i>B. napus</i> iz različnih habitatov v štiriletnem časovnem obdobju	86
4.1.6	Spremembe v alelni strukturi genotipov, ki so bili na istih lokacijah v Sloveniji vzorčeni v različnih letih znotraj štiriletnega obdobja	88
4.1.7	Genetska analiza genskega sklada referenčnih genotipov vrste <i>B. napus</i> in referenčnih genotipov njenih spolno kompatibilnih sorodnikov znotraj družine Brassicaceae, ki se pojavljajo v slovenskem pridelovalnem prostoru	90
4.1.8	Prostorske povezave in genetska struktura spolno kompatibilnih sorodnikov vrste <i>B. napus</i>, ki se pojavljajo v slovenskem pridelovalnem prostoru	94
4.1.9	Prostorsko vrednotenje spontanega intra- in interspeciesnega križanja vrste <i>B. napus</i> in njenih spolno kompatibilnih sorodnikov znotraj družine Brassicaceae v štiriletnem časovnem obdobju po statističnih regijah v Sloveniji	96
4.1.10	Časovna opredelitev ocene prenosa genov med pojavnimi oblikami vrste <i>B. napus</i> in vsemi referenčnimi genotipi (vrste <i>B. napus</i> in njenih spolno kompatibilnih sorodnikov) v Sloveniji	98
4.2	PRIMERJAVA PRIKAZA IN OBDELAVE REZULTATOV NA DIPLOIDNEM IN TETRAPLOIDNEM NIVOJU	102
4.2.1	Analiza genetske raznolikosti vseh obravnavanih genotipov na diploidnem nivoju	102
4.2.2	Analiza genetske raznolikosti vseh obravnavanih genotipov na tetraploidnem nivoju	106

4.2.3	Primerjava rezultatov analiz med diploidnim in tetraploidnim nivojem	108
4.3	ANALIZA PRISOTNOSTI GENSKO SPREMENJENIH ORGANIZMOV VRSTE <i>B. napus</i> V SLOVENIJI	110
4.3.1	Kvalitativna PCR-analiza za določitev gensko spremenjenih organizmov vrste <i>B. napus</i>	111
4.3.1.1	Preverjanje prisotnosti endogenega gena oljne ogrščice (kruciferina)	111
4.3.1.2	Preverjanje prisotnosti genskega elementa EPSPS	111
4.3.1.3	Preverjanje prisotnosti 35S-promoterja	112
4.3.1.4	Preverjanje prisotnosti Nos-terminatorja	113
4.3.1.5	Preverjanje prisotnosti bar gena	113
4.3.2	Določitev gensko spremenjenih organizmov vrste <i>B. napus</i> z uporabo Q-PCR-analize	114
4.4	SKUPNI POVZETEK REZULTATOV	115
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	116
5.1	RAZPRAVA	116
5.1.1	Zbiranje in pojavnost genskih virov vrste <i>B. napus</i> ter njenih spolno kompatibilnih sorodnikov	116
5.1.2	Ustreznost načina obdelave rezultatov	117
5.1.3	Vrednotenje mikrosatelitnih markerjev	119
5.1.4	Genetska raznolikost znotraj vrste <i>B. napus</i> in vrednotenje intraspeciesnih križanj	121
5.1.5	Genetska raznolikost spolno kompatibilnih sorodnikov in vrednotenje interspeciesnih križanj z vrsto <i>B. napus</i>	124
5.1.6	Analiza prisotnosti gensko spremenjenih organizmov	128
5.2	SKLEPI	128
6	POVZETEK (SUMMARY)	132
6.1	POVZETEK	132
6.2	SUMMARY	135
7	VIRI	139

ZAHVALA
PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: SKS-ji vrste <i>B. napus</i> (Scheffler in Dale 1994; Stace, 1997; Salisbury, 2002)	27
Preglednica 2: Referenčne sorte vrste <i>B. napus</i> , vključene v analizo genetske raznolikosti (Liste ..., 2005, 2012)	42
Preglednica 3: Referenčni genotipi SPK, vključeni v analizo genetske raznolikosti	45
Preglednica 4: Mikrosatelitni markerji, uporabljeni v analizi genetske raznolikosti	48
Preglednica 5: Pari začetnih oligonukleotidov, uporabljeni v kvalitativni PCR-analizi za določitev prisotnosti gensko spremenjenih organizmov	68
Preglednica 6: Pari začetnih oligonukleotidov, uporabljeni v Q-PCR-analizi za določitev prisotnosti gensko spremenjenih organizmov	69
Preglednica 7: Parametri variabilnosti po posameznih lokusih	74
Preglednica 8: Vrednosti parnih primerjav podivjanih populacij glede na statistične regije na podlagi Neijeve nepristranske genetske enakosti (pod diagonalo) in vrednosti F_{st} , izračunane na podlagi frekvenc alelov (nad diagonalo)	84
Preglednica 9: Delež vključenosti genotipov iz različnih habitatov v tri genetske skupine na podlagi Bayesove klastrske analize	88
Preglednica 10: Primerjava genetskih profilov genotipov, ki so bili na isti lokaciji vzorčeni v različnih letih	89
Preglednica 11: Parametri genetskih primerjav genotipov, vzorčenih na istih lokacijah v različnih letih	89
Preglednica 12: Parametri variabilnosti, indeksi fiksacij in število migrantov po posameznih lokusih	90
Preglednica 13: Rezultati analize AMOVA na podlagi F - in R -statistike, vključno z indeksi fiksacij glede na vir variabilnosti za genotipe znotraj statističnih regij v Sloveniji za obdobje 2007–2010	97
Preglednica 14: Parametri za vrednotenje prenosa genov med pojavnimi oblikami vrste <i>B. napus</i> in referenčnimi sortami vrste <i>B. napus</i> ter njenimi SKS-ji po posameznih letih vzorčenja v Sloveniji	99
Preglednica 15: Časovna opredelitev rezultatov analize AMOVA, v katero so vključeni tudi vsi referenčni genotipi	99
Preglednica 16: Časovna opredelitev rezultatov analize AMOVA na podlagi predhodne razdelitve v skupine, v katere so vključeni tudi vsi referenčni genotipi	100
Preglednica 17: Ocena prenosa genov (število migrantov – N_m) in njihove ustalitve (oprašitveni koeficient – F_{st}) prek spontanih križanj med posameznimi leti v Sloveniji	101
Preglednica 18: Parametri variabilnosti po posameznih lokusih, vrednosti fiksacijskih indeksov F_{is} , F_{it} in F_{st} ter število migrantov na posameznem lokusu	103
Preglednica 19: Rezultati analize AMOVA na podlagi predhodno razvrščenih populacij v skupine glede na njihov izvor	105

Preglednica 20: Povprečne vrednosti genetskih razdalj in oprašitvenih koeficientov znotraj genetskih skupin, izračunane na podlagi Bayesovega pristopa v klasterski analizi	106
Preglednica 21: Povprečne vrednosti genetskih razdalj in oprašitvenih koeficientov znotraj genetskih skupin, izračunane z uporabo Bayesovega pristopa v klasterski analizi na podlagi 4n-kodominantne vhodne matrike	108
Preglednica 22: Vrednotenje genetske raznolikosti po različnih nivojih glede na posamezno pojavno obliko vrste <i>B. napus</i> in njenih SKS	115

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Trikotni U-diagram (Nagaharu, 1935)	4
Slika 2: Kariotipi treh genetsko povezanih genomov – <i>B. rapa</i> , <i>B. oleracea</i> in <i>B. napus</i> (Friedt in Snowdon, 2009)	5
Slika 3: Strukturni model ohranjanja semena v talni semenski banki (Squire in sod., 2003)	16
Slika 4: Pridelava oljne ogrščice v Sloveniji v obdobju 1991–2011 (Rastlinska pridelava ..., 2011)	21
Slika 5: Samosevci vrste <i>B. napus</i> v posevku travno-deteljne mešanice	25
Slika 6: Posevek oljne ogrščice	25
Slika 7: Podivjane populacije vrste <i>B. napus</i> ob cestni infrastrukturi	25
Slika 8: Pregled lokacij vzorčenja glede na pojavno obliko vrste <i>B. napus</i> v obdobju 2007–2010	39
Slika 9: Pregled lokacij vzorčenja glede na pojavnost SKS-jev v času cvetenja oljne ogrščice v letih 2008 in 2010	40
Slika 10: Prikaz lokacij terenskega vzorčenja samosevnih in podivjanih populacij vrste <i>B. napus</i> v letih 2007 in 2008 za analizo prisotnosti gensko spremenjenih organizmov	65
Slika 11: Število pobranih vzorcev rastlin vrste <i>B. napus</i> na terenu v štiriletnem časovnem obdobju glede na njihovo pojavno obliko	71
Slika 12: Obseg lokacij vzorčenja posevkov, samosevnih in podivjanih populacij vrste <i>B. napus</i> v posameznih letih glede na statistične regije v Sloveniji	72
Slika 13: Obseg lokacij vzorčenja SKS-jev vrste <i>B. napus</i> v posameznih letih glede na statistične regije v Sloveniji	73
Slika 14: Radialno drevo referenčnih sort vrste <i>B. napus</i> , izdelano na podlagi Ds- in UPGMA-metode združevanja, ki vključuje obliko gojenja in tip uporabe	76
Slika 15: Genetske povezave med posameznimi genotipi znotraj referenčnih sort vrste <i>B. napus</i> in med njimi, predstavljene na osnovi DAS-matrike in NJ-metode združevanja	77
Slika 16: Primerjava alelnih vzorcev v genetski strukturi med referenčnimi sortami in samosevnimi populacijami vrste <i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	79
Slika 17: Prikaz genetske strukture referenčnih genotipov znotraj sort in samosevnih genotipov znotraj statističnih regij vzorčenja samosevnih populacij v obdobju 2007–2010 na podlagi treh genetskih skupin	80
Slika 18: Ocena aposteriorne verjetnosti, da genotipi samosevnih populacij pripadajo trem genskim skupinam, ki združujejo referenčne sorte vrste <i>B. napus</i> (subsp. <i>napus</i> in subsp. <i>napobrassica</i>) in referenčne genotipe SKS	80
Slika 19: PCoA-analiza genotipov samosevnih populacij in genotipov referenčnih sort vrste <i>B. napus</i> in njenih SKS-jev	81
Slika 20: Vzorci pojavljanja alelov v podivjanih populacijah in referenčnih sortah vrste <i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	83
Slika 21: Razporeditev genotipov podivjanih populacij in referenčnih sort v PcoA-analizi	83

Slika 22: Razporeditev podivjanih populacij znotraj statističnih regij po Sloveniji glede na rezultate PcoA-analize, pridobljene na podlagi njihove genetske povezanosti	85
Slika 23: Alelna struktura podivjanih populacij in genetska raznolikost znotraj njih glede na njihovo geografsko pojavljanje v Sloveniji v obdobju 2007–2010	85
Slika 24: Razporeditev genotipov vrste <i>B. napus</i> iz različnih habitatov v PcoA-analizi	87
Slika 25: Genetska pripadnost posameznih genotipov iz različnih habitatov po celotni Sloveniji v obdobju 2007–2010	88
Slika 26: Filogenetsko drevo sort vrste <i>B. napus</i> in njenih SKS-jev, ki so se v Sloveniji pojavljali v obdobju 1984–2010	92
Slika 27: Razporeditev referenčnih genotipov vrste <i>B. napus</i> in njenih SKS-jev v štiri skupine glede na rezultate FCA-analize	93
Slika 28: Genetska struktura referenčnih genotipov vrste <i>B. napus</i> in njenih SKS-jev, razdeljena v štiri genetske skupine na podlagi Bayesove klastrske analize	94
Slika 29: Pripadnost genotipov vrst <i>B. rapa</i> in <i>S. arvensis</i> , vključno z referenčnimi genotipi vrste <i>B. napus</i> in njenimi SKS-ji, ki se pojavljajo v Sloveniji	95
Slika 30: Alelni vzorci znotraj vrst <i>B. napus</i> , <i>B. rapa</i> in <i>S. arvensis</i> v naravi za posamezno leto znotraj statističnih regij v Sloveniji	96
Slika 31: Razporeditev pojavnih oblik vrste <i>B. napus</i> , <i>B. rapa</i> in <i>S. arvensis</i> v FCA-analizi glede na statistično regijo v posameznem letu (različne barve) v naravnih habitatih znotraj Slovenije	98
Slika 32: Alelni vzorci vseh pojavnih oblik vrste <i>B. napus</i> v naravi v posameznem letu na območju Slovenije	100
Slika 33: Časovna razporeditev genotipov vseh pojavnih oblik vrste <i>B. napus</i> v naravnih habitatih Slovenije glede na rezultate PcoA-analize	101
Slika 34: Genetske povezave med posameznimi genotipi znotraj referenčnih sort vrste <i>B. napus</i> in med njimi, predstavljene na osnovi Ds-matrike in NJ-metode združevanja	107
Slika 35: Genetska struktura vseh genotipov v analizi genetske raznolikosti, predstavljena na podlagi klastrske analize in kodominatne vhodne matrike alelnih dolžin na 4n-nivoju	108
Slika 36: Rezultat skladnosti binarne 4n-matrike in kodominatne 2n-matrike na podlagi parnih genetskih razdalj, dobljenih z Mantelovim testom	110
Slika 37: Namnožitev endogenega gena oljne ogrščice (kruciferina) v PCR-analizi	111
Slika 38: Namnožitev EPSPS-transgena (vključen v transgeno oljno ogrščico RT/GT73) pri kontrolnih vzorcih referenčnega materiala	112
Slika 39: Namnožitev 35S-promoterja (vključen v transgeni oljni ogrščici 'Oxy235' in 'Falcon GS40/90') pri združenih vzorcih samosevnih in podivjanih populacij vrste <i>B. napus</i>	112
Slika 40: Namnožitev Nos-terminatorja (vključen v transgeni oljni ogrščici 'Oxy235' in 'MS8xRF3') pri združenih vzorcih semena oljne ogrščice	113
Slika 41: Q-PCR-profil endogenega gena (<i>FatA</i>), referenčne kontrole (transgena linija 'RT/GT73') in negativnega vzorca s terena (združeni vzorec B)	114

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Temperaturne nastavitve v kvalitativni PCR-analizi za preverjanje prisotnosti endogenega gena oljne ogrščice (kruciferina) in štirih presejalnih genskih elementov – EPSPS, p35S, tNos in bar.
- Priloga B: Lokacije terenskega vzorčenja vrste *B. napus* po celotni Sloveniji v letu 2007.
- Priloga C: Lokacije terenskega vzorčenja vrste *B. napus* po celotni Sloveniji v letu 2008.
- Priloga D: Lokacije terenskega vzorčenja vrste *B. napus* po celotni Sloveniji v letu 2009.
- Priloga E: Lokacije terenskega vzorčenja rastlin vrste *B. napus* po celotni Sloveniji v letu 2010.
- Priloga F: Lokacije terenskega vzorčenja v Sloveniji, na katerih je vzorčenje predstavnikov vrste *B. napus* potekalo več kot enkrat v obdobju 2007–2010.
- Priloga G: Lokacije terenskega vzorčenja SKS-jev vrste *B. napus* po celotni Sloveniji v letih 2008 in 2010.
- Priloga H: Lokacije zbiranja samosevnih in podivjanih populacij vrste *B. napus* v letu 2007 in 2008, ki so bile vključene v analizo prisotnosti gensko spremenjenih organizmov v Sloveniji.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

2n	diploidni
4n	tetraploidni
ABA	abscizinska kislina
AMOVA	analiza molekulske variabilnosti (variance)
Bootstrap	metoda vezanja
bp	bazni par
CaMV	virus cvetačnega mozaika
Ct	mejna vrednost pri Q-PCR-analizi
CTAB	cetil-trimetil-amonijev bromid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotid trifosfat
Ds	standardna Neijeva genetska razdalja
F	fiksacijski indeks
FAM	6-karboxyfluorescein
FCA	faktorska korespondenčna analiza
GOR	gorenjska regija
He	pričakovana heterozigotnost
HEX	6-karboksi-1,4-dikloro-2', 4', 5', 7'-tetra-klorofluorescein
HGT	horizontalni prenos genov
Hn. b.	nepistranska pričakovana heterozigotnost
Ho	dejanska heterozigotnost
I	Shannonov informacijski indeks genetske raznolikosti
JVS	jugovzhodna Slovenija
K	realno število genetskih skupin v Bayesovi klastrični analizi
LRM	Lynch-Ritlandova ocena
m	Barton-Saltkinova ocena stopnje prenosa genov
M13(-21)	univerzalno zaporedje začetnega oligonukleotida
MgCl ₂	magnezijev klorid
NaCl ₂	natrijev klorid
Ne	število učinkovitih alelov
NED	zaščiteno ime za fluorescentno označen začetni oligonukleotid
NJ	metoda združevanja najbližjih sosedov
Nm	število migrantov
No	frekvenca ničtih alelov
Np	število privatnih alelov
NTK	notranjsko-kraška regija
OBK	obalno-kraška regija
OSR	osrednjeslovenska regija
p	ocena statistično značilne verjetnosti
PcoA	analiza glavnih koordinat
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PI	verjetnost enakosti genotipov
PIC	informacijska vrednost polimorfizma

POD	podravska regija
POM	pomurska regija
r	lokalni indikator prostorske avtokorelacije
Rn	signal reakcije v Q-PCR-analizi
ROX	karboksi-X-rodamin
rx _y	Mantelov koeficient skladnosti
SAV	savinjska regija
Q-PCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času
SCR	S-lokus cysteine-rich
SI	samoinkompatibilnost
SKR	sexually compatible relatives
SKS	spolno kompatibilni sorodniki
SLG	S-lokusno specifičen protein
SPS	spodnjeposavska regija
SRK	S-lokus receptor kinase
SSI	sporofitna samoinkompatibilnost
SSR	Short Sequence Repeat ali mikrosatelit
t	stopnja tujeprašnosti
Taq polimeraza	DNA-polimeraza, izolirana iz <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	tris-boratni-EDTA-elektroforetski pufer
TCA	trikloroocetna kislina
TE	tris-EDTA-pufer
TNE	tris-NaCl-EDTA-pufer
Tris	tris (hidroksimetil) aminometan
UPGMA	metoda netehtane aritmetične sredine
UV	ultravijoličen
ZAS	zasavska regija

1 UVOD

Brassica napus L. je vsesplošno uporabna rastlina, ki spada v raznoliko družino Brassicaceae (križnice). Vrsta vključuje dve po namenu pridelave precej različni podvrsti. Prva podvrsta obsega zelenjadne predstavnike, med njimi pomembno podzemno (rumeno) kolerabo (*B. napus* L. subsp. *napobrassica* (L.) Hanelt), druga podvrsta (*B. napus* L. subsp. *napus* L.) pa združuje ozimno ter jaro in oljno ter krmno obliko navadne ogrščice (Snowdon in sod., 2007). Vrsta *B. napus* se prideluje kot krmna rastlina za krmo govedu v vegetativni fazi razvoja ali se seje za podor z namenom obogatitve tal z organsko snovjo. V največji meri pa se prideluje kot oljnica z visoko vsebnostjo olja v semenu. Prav zato se ime *B. napus* v tej doktorski disertaciji nanaša na oljno oziroma krmno ogrščico (*B. napus* subsp. *napus*), razen če ni posebej omenjeno, da gre za podzemno kolerabo. Vsa imena vključenih vrst so uporabljena z latinskimi imeni (razen tam, kjer se tema nanaša izključno na oljno ogrščico), saj v literaturi, pri prevajanju in v drugih objavah obstajajo velika razhajanja v poimenovanju določene vrste. Posebno pri poimenovanju znotraj družine Brassicaceae vlada na tem področju precejšnja neenotnost, zato smo se odločili za latinsko poimenovanje, in sicer z namenom, da jasno opredelimo, kateri genotipi znotraj katere vrste, podvrste ali sorte so vključeni v katero izmed analiz, saj doktorska disertacija zajema obsežen genski sklad, ki pripada družini Brassicaceae.

B. napus je najpomembnejša oljnica zmernega klimatskega pasu in je tipična industrijska rastlina. V naših podnebnih razmerah se kot oljnica prideluje ozimna/dvoletna oblika (forma *biennis*), medtem ko se jara/enoletna (forma *annua*) oblika prideluje le kot dosevek za podor ali svežo krmo. Povečan interes za njeno pridelavo v zadnjem desetletju je posledica nove kmetijske politike ob vstopu Slovenije v Evropsko unijo. Obseg pridelovalnih površin se je v zadnjih letih povečal tudi na račun ukinitve pridelave sladkorne pese, namesto katere je vrsta *B. napus* subsp. *napus* postala pomemben člen v kolobarju konvencionalnega, integriranega in ekološkega kmetovanja. Različna področja njene uporabe še vedno narekujejo različne cilje klasičnih metod žlahtnjenja in vedno bolj tudi uporabo novejših biotehnoloških metod (genetski inženiring). Olje se v predelovalni industriji uporablja predvsem za namene pridobivanja biogoriv, genotipi z nizko vsebnostjo glukozinolatov in eruka kisline pa za pridobivanje visokokakovostnega rastlinskega jedilnega olja. Uporabnost vrste *B. napus* subsp. *napus* kot surovine je razširjena tudi v lipokemiji (genotipi z visoko vsebnostjo eruka kislin) in fitofarmaciji (genotipi z visoko vsebnostjo glukozinolatov) (Eastham in Sweet, 2002). Zelo pomembna je tudi ekološka funkcija pridelave vrste *B. napus*, saj v času polnega cvetenja nudi pašo čebelarom in s svojo rumeno barvo močno popestri videz pokrajine. S stališča varstva okolja se biogorivo kot obnovljiv vir energije v zadnjih letih zelo uveljavlja, predvsem zaradi stalne dražitve fosilnih goriv.

B. napus je ena izmed najbolj perspektivnih oljnic tudi v Sloveniji, in to predvsem zaradi možnosti večnamenske uporabe (prehrana, živalska krma, biogorivo, farmakologija, ekološka funkcija). Kot pomemben člen v kolobarju se pojavlja v vseh sistemih kmetijske pridelave, s svojo prisotnostjo pa omogoča oprasčevanje s samosevnimi in podivjanimi populacijami znotraj in zunaj pridelovalnih površin. V osnovi je *B. napus* samoprašna rastlinska vrsta, vendar pa se lahko v odvisnosti od posameznega genotipa in specifičnih vplivov okolja delež tujeprašnosti spreminja (Friedt in Snowdon, 2009). Oprasčujejo jo

predvsem čebele, lahko pa tudi veter. Zaradi variabilne stopnje tujeprašnosti v naravi prihaja do oprasitev znotraj vrste (intraspecijsna križanja), in sicer med posevki, samosevnimi rastlinami (znotraj pridelovalnih površin) ter podivjanimi populacijami (zunaj pridelovalnih površin). Prisotnost teh rastlin v pridelovalnem prostoru je posledica neustreznih agrotehničnih ukrepov, izgub semena med žetvijo (spravilom), transportom in skladiščenjem, saj je seme zelo drobno, mobilno in zato nagnjeno k raztrosu. Poleg tega so možna tudi nenadzorovana medvrstna oprasovanja (interspecijsna križanja) vrste *B. napus* z njenimi spolno kompatibilnimi sorodniki (SKS) iz družine Brassicaceae. Te rastline se v naravi pojavljajo predvsem kot plevelne rastline ob obrobjih njiv, lahko pa tudi kot divje rastoče na neobdelanih območjih. Križanja znotraj vrste *B. napus* in med vrstami znotraj družine križnic kratkoročno vplivajo na kakovost posevkov in sortno čistost, dolgoročno pa ohranjanje takega semena v tleh omogoča nenadzorovano spreminjanje genetskega potenciala rastlin vrste *B. napus*, saj se v naslednjih letih lahko pojavljajo kot neopredeljen oprasovalni vir (z ohranjenimi geni spolno kompatibilnih rastlin, ki so lahko kultivirane, podivjane ali celo gensko spremenjene) (Treu in Emberlin, 2000). V naravnih pogojih pridelave je zaradi genetskega izvora in variabilne stopnje tujeprašnosti nadzor nad oprasovanjem vrste *B. napus* praktično nemogoč, mogoče pa je identificirati izvor različnih pojavnih oblik in opredeliti posledice nenadzorovanih križanj na nivoju DNA z uporabo ustreznih molekulskih markerjev. Za opis organizmov na različnih nivojih se uporabljajo genetski markerji, s pomočjo katerih poskušamo določiti raznolikost med posameznimi rodovi, vrstami, sortami, populacijami itd. Za razlikovanje med organizmi se uporabljajo morfološki, biokemijski in molekulski markerji. Glede na različne karakteristike posameznih markerjev in njihov namen uporabe ločimo več vrst molekulskih markerjev, med njimi tudi mikrosatelitne markerje ali SSR-je (angl. Simple Sequence Repeat), ki smo jih uporabili v doktorski disertaciji. Pomembna lastnost mikrosatelitov, ki jih loči od večine molekulskih markerjev, je ta, da se v verižni reakciji s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction – PCR) namnožujejo predhodno poznane sekvence (lokusi) DNA, ki so določene z nukleotidnim zaporedjem paraspecifičnih začetnih oligonukleotidov. Odlikuje jih visoka pogostnost pojavljanja in enakomerna razporejenost v genomih evkariontov, so kodominatni, hipervariabilni, visoko polimorfni in zato tudi zelo informativni (Štajner, 2010). Vse našteje prednosti so tudi glavni razlog uporabe mikrosatelitov v študiji o možnostih in stopnji oprasovanj med pojavnimi oblikami vrste *B. napus* v različnih habitatih v Sloveniji. Preverjanja na morfološkem in biokemijskem nivoju zaradi periodičnega terenskega zbiranja rastlinskega materiala, nespecifičnih morfoloških razlik med rastlinami in nezmožnosti ocene stopnje prenosa genov v tej študiji ne bi bila zadosti informativna in uporabna v primerjavi z analizo na nivoju DNA.

Obstaja tudi možnost uvajanja gensko spremenjenih genotipov vrste *B. napus* v slovenske sisteme pridelave, ki bi posledično v pridelovalni prostor prinesli nove oprasovalne vire s transgenimi lastnostmi, ti pa bodo posredno ali neposredno vplivali na oprasovalne odnose z vrsto *B. napus*. Lahko pa prihaja tudi do pojava transgenih rastlin, ki so posledica (tranzitnega) raztrosa vzdolž transportne infrastrukture na območju Slovenije.

Študija genetske raznolikosti vrste *B. napus* in njenih SKS-jev ter ugotavljanja prenosa genov prek spontanega oprasitve v Sloveniji je bila zasnovana na podlagi časovne in prostorske dimenzije. Šlo je za periodično vzorčenje rastlinskega materiala v štiriletnem časovnem obdobju na območju slovenskih statističnih regij, saj smo želeli, da bi bili

rezultati odraz dejanskega stanja opraševalnih zmožnosti vrste *B. napus* znotraj družine Brassicaceae v slovenskem pridelovalnem prostoru. Iz tega razloga smo v doktorski disertaciji proučili naslednje hipoteze, saj smo želeli dokazati, da:

- se največ samosevnih in podivjanih populacij vrste *B. napus* ter njenih SKS-jev v naravi na območju Slovenije pojavlja znotraj statističnih regij, kjer je tudi pridelava vrste *B. napus* najbolj zastopana;
- je genetski sklad referenčnih sort vrste *B. napus* in njenih SKS-jev, ki so se v Sloveniji pridelovali v obdobju 1984–2010, zelo raznolik;
- so samosevne in podivjane populacije genetsko bolj raznolike od referenčnih sort vrste *B. napus*;
- je mogoče opredeliti intra- in interspeciesni prenos genov ter stopnjo tujeprašnosti med vsemi pojavnimi oblikami vrste *B. napus* v naravi in njenimi SKS-ji glede na prostor in čas;
- je stopnja tujeprašnosti vrste *B. napus* v slovenskem pridelovalnem prostoru znotraj variabilnega območja izračunanih stopenj tujeprašnosti, ki jih navaja literatura;
- obstaja možnost ustalitve prenesenih genov prek spontanega križanja v podivjane populacije vrste *B. napus*;
- je izvor samosevnih in podivjanih populacij povezan z genetskimi profili referenčnih genotipov sort vrste *B. napus*, ki so se na območju Slovenije pridelovali v preteklih letih, kar bi potrdilo predvidevanja, da se lahko izgubljeno seme samoohranja v tleh več let in predstavlja potencial za pojav podivjanih populacij vrste *B. napus*;
- obstaja genetska raznolikost med komercialnimi (referenčnimi) genotipi vrste *B. napus*, ki so se v obdobju 1984–2010 pridelovali na območju Slovenije;
- obstaja genetska raznolikost med referenčnimi genotipi sort SKS-jev iz družine Brassicaceae, ki se pojavljajo v Sloveniji;
- je informativnost uporabe izbranega seta mikrosatelitnih markerjev ustrezna za obdelavo rezultatov v obliki kodominantnih vhodnih matrik na diploidnem (2n) in tetraploidnem (4n) nivoju;
- skupina vzorcev rastlin (nabranih v letih 2007 in 2008), ki so vključevali samosevne in podivjane rastline, ter skupina vzorcev zrnja – pridelka vrste *B. napus* (oljne ogrščice) v Sloveniji v letu 2008 ne vsebuje gensko spremenjenih organizmov, ki so v Evropi dovoljeni za hrano in krmo, oziroma gensko spremenjene vrste *B. napus*, ki vsebuje enega ali več izmed naslednjih genskih elementov: bar, EPSPS, p35S in tNOS.

V skladu z raziskovalnimi hipotezami doktorska disertacija zajema:

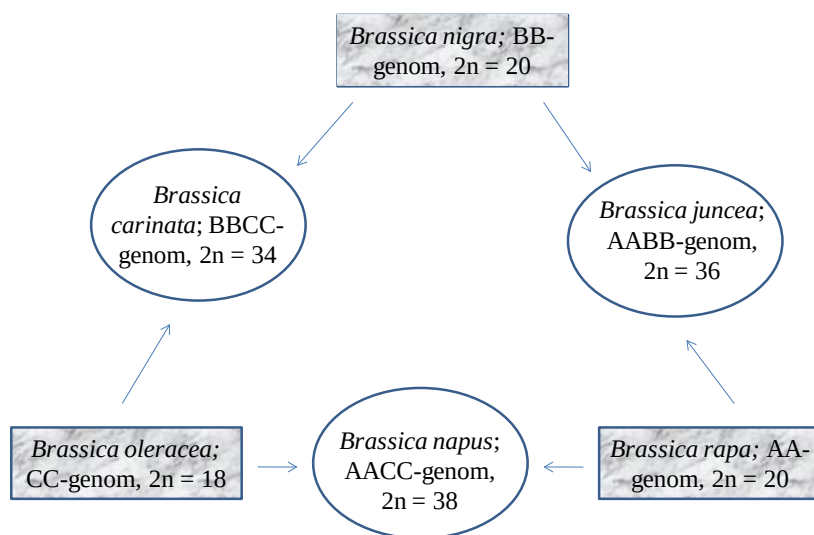
- analizo genetske raznolikosti genskega sklada vrste *B. napus* in njenih SKS-jev iz družine Brassicaceae, ki se pojavljajo v slovenskem prostoru;
- oceno stopenj prenosa genov prek spontanega intra- in interspeciesnega oprašitve v štiriletnem časovnem obdobju na območju Slovenije;
- primerjavo obdelav rezultatov zgornjih dveh točk na 2n- in 4n-nivoju;
- analizo prisotnosti gensko spremenjenih organizmov vrste *B. napus* v slovenskem pridelovalnem prostoru, ki je v Evropi dovoljena za hrano in krmo do uvedbe Zakona o soobstoju gensko spremenjenih rastlin z ostalimi kmetijskimi rastlinami (2009).

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZNAČILNOSTI VRSTE *B. napus*

2.1.1 Genetski izvor

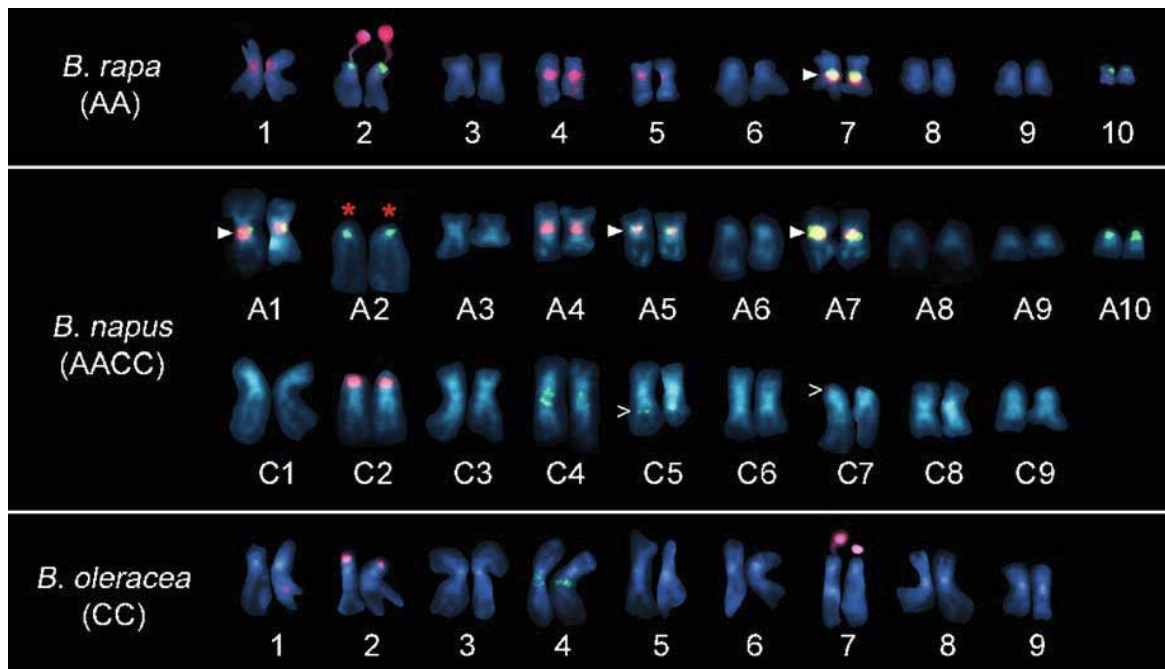
Prvotna divja oblika vrste *B. napus* v naravi je nastala s spontanim medvrstnim križanjem med repo (*Brassica rapa* L. ali *Brassica campestris* L.) in zeljem (*Brassica oleracea* L.) na območju Evrope in Azije. Tudi njene sorodne vrste iz rodu *Brassica* so se pridelovale že v času starega Rima in Galije, zapise o najdbah semen teh vrst pa so našli tudi na območju Nemčije in Švice ter so še iz časa bronaste dobe (Schiemann, 1932). Rod *Brassica* vsebuje šest gojenih in ekonomsko pomembnih vrst, ki so genetsko povezane z vrsto *B. napus*. Teorija o evoluciji in odnosih teh vrst razlaga, da so bili v času nastanka s kombinacijo genomov treh predniških vrst iz rodu *Brassica* ustvarjeni trije novi medvrstni križanci. Ta teorija je bila objavljena leta 1935 pod avtorstvom korejskega botanika Woo Jang-choona, ki se je kasneje, ko je deloval na Japonskem, preimenoval v Nagaharu U. Po njem je tudi teorija trikotnega diagrama dobila ime »Triangle of U«, znanstveno pa je bila potrjena tudi z genetskimi analizami (Nagaharu U., 1935). Trikotni diagram razlaga nastanek treh $4n$ -vrst, ki so nastale z medvrstnim križanjem $2n$ -staršev in se zato imenujejo amfidiploidi. Omenjeni novonastali genomi so etiopska gorjušica (*Brassica carinata* L., BBCC-genom), rjava gorjušica (*Brassica juncea* L., AABB-genom) in navadna ogrščica (*B. napus*, AACC-genom), ki imajo skupnega enega od staršev. Izvirne vrste (starši) v trikotnem diagramu so: črna gorjušica (*Brassica nigra* L., BB-genom), repa (*B. rapa*, AA-genom) in zelje (*B. oleracea*, CC-genom) (slika 1) (Friedt in Snowdon, 2009).



Slika 1: Trikotni U-diagram (Nagaharu, 1935)
Figure 1: Triangle of U-diagram (Nagaharu, 1935)

Song in Osborn (1992) sta objavila študijo na nivoju mitohondrijske in kloroplastne DNA, v kateri navajata, da naj bi bila vrsta *Brassica montana* ($2n = 18$) genetsko zelo blizu prototipu, ki je nastal z združevanjem citoplazem iz vrst *B. rapa* in *B. oleracea*. Predvideva se, da je *B. napus* relativno mlada vrsta, ki se je razvila le nekaj stoletij nazaj. Spontano

križanje vrst *B. rapa* in *B. oleracea* naj bi se zgodilo ob sočasnem gojenju obeh vrst na majhnem geografskem območju mediteranske regije (Friedt in Snowdon, 2009). Kariotipi vseh treh vrst so predstavljeni na sliki 2.



Slika 2: Kariotipi treh genetsko povezanih genomov – *B. rapa*, *B. oleracea* in *B. napus* (Friedt in Snowdon, 2009)

Figure 2: Karyotypes of genetically linekd genomes; *B. rapa*, *B. oleracea* and *B. napus* (Friedt and Snowdon, 2009)

2.1.2 Biološke značilnosti

B. napus je v osnovi samoprašna rastlinska vrsta, vendar je lahko ob ugodnih pogojih pridelave delež tujeprašnosti tudi od 5- do 47-odstoten (Friedt in Snowdon, 2009). Prenos peloda poteka prek žuželk na različnih razdaljah; poleg tega je mogoč tudi z vetrom, ki pa je manj pomemben na daljših razdaljah (Treu in Emberlin, 2000). Cvet je sestavljen iz štirih časnih in štirih venčnih listov, enega pestiča in šestih prašnikov (štirje notranji so daljši, dva zunanja pa sta krajša). Na rastlini je približno 2000 cvetov, od katerih najprej zacvetijo zgornji, kasneje pa spodnji cvetovi. Cvetenje ozimnih sort poteka v normalnih letih v mesecu maju. Plod oljne ogrščice je lusk, ki leži pravokotno na steblo. Lusk se odpira po hrbtni in po trebušni strani, v enem pa je 20–30 semen (Kocjan Ačko, 1999). *B. napus* je lahko enoletna ali dvoletna rastlina (McNaughton, 1995). Enoletno obliko imenujemo tudi jara oblika (forma *annua*), saj jo posejemo in spravimo v istem letu, vendar se pri nas zaradi specifičnih pridelovalnih razmer (prekratka vegetacijska doba) kot oljnica ne prideluje – prideluje se le kot krmna oblika. Dvoletno ali ozimno obliko (forma *biennis*) pa sejemo pozno poleti ali zgodaj jeseni ter jo tako čez zimo izpostavimo vernalizaciji, naslednje leto v poletnih mesecih pa jo požanjemo (Butruille in sod., 1999). Seme vrste *B. napus* je drobno, gladko in okroglo, zato se ob spravilu, pri dodelavi, predelavi in transportu zelo lahko nenadzorovano izgublja. Zaradi svoje majhnosti se lepi oziroma obdrži na kmetijskih strojih in strojih za dodelavo zrnja.

Polja rumeno cvetočih rastlin vsako leto v mesecu maju privabljajo naše poglede, vendar pa je njihovo pravilno poimenovanje za veliko večino ljudi prava uganka. Večina ji namreč pravi kar »repica«, v resnici pa so to posevki vrste *B. napus* (oljne ogrščice) in ne vrste *B. rapa* (oljne repice). Botanično sta ti dve rastlini dve različni vrsti, ki spadata v skupen rod *Brassica*. Njune morfološke razlike so sicer minimalne, vendar ju v naravi lahko ločimo predvsem na podlagi oblike korenin, barve listov ter pozicije odprtih in neodprtih cvetov v socvetju v času cvetenja. Oljna ogrščica se prideluje za hrano, krmo in v industrijske namene, oljna repica pa je uporabna predvsem v industriji (Pipan, 2011). Glede na sposobnost prezimitve obstajajo jare in ozimne oblike vrste *B. napus*. Jari (jari ali enoletni) posevki obeh vrst se v vegetativni fazi rasti v naših klimatskih pogojih lahko pridelujejo za svežo ali silažno krmo živalim ter za podor v smeri obogatitve tal z organsko in antimikrobno komponento (Kocjan Ačko, 1999). Ozimne (dvoletne) sorte pa se pridelujejo predvsem za pridobivanje olja.

B. napus ima dva ledvičasta klična lista, debelejša steblo, rahlo odebeljen zgornji del korenine (v primerjavi z vrsto *B. rapa*) in modrozeleno gladke liste (Kocjan Ačko, 1999). Cvetovi so svetlorumene barve in nekoliko večji od cvetov vrste *B. rapa* ter se nahajajo pod popki v grozdastem socvetju (Simard in sod., 2006). Dozorelo seme je temnorjave do modročrne barve, pod lupo je njegova površina fino pikčasta do slabo mrežasta in je nekoliko debelejša od semena *B. rapa* (Kocjan Ačko, 1999). Glede na to, da se pridelava oljne vrste *B. napus* v zadnjih letih zelo širi, bi si želeli, da bi bilo tudi njeno poimenovanje pravilno. Izraz, da je to še vedno (oljna) repica, verjetno izvira tudi iz obdobja pred našo osamosvojitvijo, saj dejanski prevod »oljna ogrščica« v hrvaškem jeziku pomeni »uljana repica«. Zamenjava, ki smo jo nekako podedovali, pa naj ne bo opravičilo, da dve po videzu sicer zelo podobni rastlinski vrsti zamenjujemo, saj so genetske razlike med njima tolikšne, da tudi botanično vsaka spada v drugo vrsto.

2.1.3 Žlahtnjenje

2.1.3.1 Cilji žlahtnjenja

Klasično žlahtnjenje kmetijskih rastlin se je v Sloveniji začelo razvijati že na začetku 20. stoletja. V tem času se je veliko prihodnjih slovenskih žlahtniteljev izobraževalo v tujini in so tako svoje znanje uporabili tudi pri nas. Slovenski žlahtnitelji so vzgajali nove sorte žit, koruze, krompirja, hmelja, oljnic, vrtnin, trav, detelj, sadnih rastlin in vinske trte (Huremagič, 2005). Vsekakor so bile tu uporabljene klasične žlahtniteljske metode, ki so potekale z odbiro najboljših rastlin, ki so se izoblikovale prek različnih klimatskih in talnih razmer, velike pestrosti krajine, specifične izoliranosti ter prek različnih načinov uporabe in gojenja. V vsem tem je bil namen vzgajati rastline z najboljšimi in najbolj ustreznimi lastnostmi za slovenske pridelovalne razmere. Na Semenogojški postaji v Beltincih, ki je bila ustanovljena leta 1922, so žlahtnili žita, krmne in industrijske rastline. Tam so vzgajali tudi avtohtono slovensko sorto krmne ogrščice z imenom 'Starška', ki je bila požlahtnjena iz populacij iz okolice Starš. Sorta 'Viva' je prav tako požlahtnjena iz avtohtonega materiala (Meglič in sod., 2005). Danes v Sloveniji žlahtnjenje poteka na Kmetijskem inštitutu Slovenije, na Biotehniški fakulteti, v Semenarni, d. d., Ljubljana, na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec in v podjetju Oswald, d. o. o. Avtohtone slovenske sorte,

avtohtone populacije, stare sorte, linije in kloni, pomembni za žlahtnjenje, so shranjeni v genskih bankah, ki se nahajajo tudi pri vseh prej omenjenih žlahtniteljskih ustanovah (Meglič in sod., 2003). Sodobne biotehnološke metode omogočajo še korak naprej k pridobivanju rastlin, ki nosijo za človeka uporabne lastnosti. To je sodobno pridobivanje transgenih rastlin, ob uporabi katerih pa se porajajo dvomi o njihovi primernosti oziroma škodljivosti za človeka in okolje.

Glede na slovenske pridelovalne razmere naši pridelovalci pridelujejo le ozimno (dvoletno) oljno ogrščico, zato smo se pri žlahtniteljskih ciljih omejili predvsem na ozimne sorte – čeprav so cilji žlahtnjenja obeh pridelovalnih oblik (ozimne in jare) precej podobni.

Znano je, da z različnimi cilji žlahtnjenja poskušamo pridobiti lastnosti posevkov, ki jih želimo. Tako so lahko ti cilji bodisi pridelovalno (lastnosti, uporabne za pridelovalca v obdobju pridelave) bodisi predelovalno usmerjeni (uporabnost za predelovalno industrijo) ali pa so usmerjeni v kakovost pridelanega zrnja (pomembno za prehrambno in krmno industrijo). Snowdon in sod. (2007) v svoji objavi navajajo štiri glavne skupine lastnosti v žlahtniteljskih programih vrste *B. napus*:

- agronomske lastnosti (tolerance na pozno setev, odpornost na zimske razmere, višina rastlin, odpornost na izdolževanje rastlin, zgodnja zrelost, izraba dušika, toleranca na sušo, odpornost zrnja na drobljenje, toleranca na herbicide);
- odpornosti na bolezni in škodljivce (*Phoma* sp. *Vericillium* sp., *Cylindrosporium* sp., *Sclerotinia* sp., TuYV-virus);
- značilnosti pridelka (količina pridelka, vsebnost olja v semenu/zrnu, žetveni indeks, nizka vsebnost eruka kisline ($< 0,2\%$), nizka vsebnost glokozinolatov (< 18 mmol/kg semena), zmanjšana vsebnost lignina in izboljšana prebavljivost za monogastrične živali).

Vsekakor pa med naštetimi cilji še vedno prednjačijo tisti, ki so povezani s pridelavo.

2.1.3.2 Žlahtniteljske metode

V večini so sorte vrste *B. napus* čiste linije, ki so rezultat žlahtniteljskih shem za samoprašne rastline po principu selekcije s spremljanjem rodovnika oziroma modifikacije le-te. Tehnika povratnega križanja pa se uporablja za vnos dednih lastnosti (nizka vsebnost eruka kisline in glukozeinolatov) v prilagojen žlahtniteljski material. Uvedba selekcije s pomočjo markerjev (angl. Marker Assisted Selection – MAS) ima pomemben vpliv pri rutinskem žlahtnjenju, kot na primer v shemah povratnega križanja.

Rekurentna selekcija kot metoda populacijskega žlahtnjenja v svoj program vključuje mnogotere starše in omogoča akumulacijo zelenih alelov ob hkratnem ohranjanju genetske raznolikosti. Na začetku so jo uporabljali pri tujeprašnicah, najprej pri koruzi, posledično pa se je njena uporaba razširila tudi med samoprašne rastline. Danes je ta metoda zelo razširjena, predvsem pri žlahtnjenju ječmena, riža, soje, ovsa in pšenice (Liu in sod., 2007). Rekurentna selekcija se uporablja za izboljšanje populacij tako samoprašnih kot tudi tujeprašnih rastlin iz rodu *Brassica*. V času rekurentne selekcije je genetska variabilnost populacije heterozigotnih osebkov izražena kot posledica medsebojnega križanja več različnih staršev. Odbira osebkov poteka na osnovi najboljših lastnosti posameznih osebkov in lastnosti njihovega potomstva ter na osnovi njihovih kombinacijskih

sposobnosti. Odrbane rastline se medsebojno križa in tako se formira nova populacija, na kateri temeljijo vsi nadaljnji ciklusi selekcije. Različne metode rekurentne selekcije se uporabljajo za izboljšanje kvantitativno dedovanih lastnosti, ki se dedujejo z večjim številom genov. Žlahtniteljski programi zato vsebujejo tudi povratna križanja, ki omogočajo prenos genov iz ene linije (donor) v drugo (rekurentni starš) (npr. vnos moške sterilnosti). Ta postopek se uporablja pri enostavnem dedovanju in za lastnosti z visoko heritabilnostjo. Po začetnem križanju so posamezni osebki, ki imajo želene lastnosti donorske rastline, odbrani, nato pa nekajkrat povratno križani z rekurentnim staršem. Po nekaj generacijah teh povratnih križanj naj bi te rastline imele ključne lastnosti/attribute rekurentnega starša in želene lastnosti donorske rastline. Ta metoda se uporablja predvsem za vzgojo odpornih fenotipov na različne bolezni pri veliko rastlinskih družinah, v družini Brassicaceae pa je ta postopek uporaben predvsem za vzgojo linij z nizko vsebnostjo eruka kisline in glukozinolatov (toksični substanci v hrani in krmi) (Liu in sod., 2007). Učinkovitost rekurentne selekcije je predvsem odvisna od izhodiščne genetske variabilnosti želene lastnosti in variabilnosti v naslednjih generacijah. V študijah, v katerih za različne poljščine uporabljajo molekulske markerje za vrednotenje genetske variabilnosti, so ugotovili, da se pri rekurentni selekciji genetska variabilnost oža z višjim številom ciklov. Prav zato je pomembno nadzorovati genetsko variabilnost skozi celoten postopek rekurentne selekcije, za kar so uporabni molekulski markerji, s katerimi je mogoče vrednotiti genetsko raznolikost osebkov. V študiji, ki so jo izvedli Yuan in sod. (2004), so predstavljene različne stopnje genetske raznolikosti glede na uporabo različnih žlahtniteljskih metod. Primerjali so genetsko podobnost med osnovnimi populacijami pri rekurentni selekciji z linijami pri selekciji s spremljanjem rodovnika. Rekurentna selekcija je ena izmed najpomembnejših metod selekcije pri populacijskem žlahtnjenju rastlin, ki je trenutno najbolj uveljavljena pri koruzi. Osnovni cilj rekurentne selekcije je povečanje zelenih genov v populaciji in izboljšanje osnovne populacije brez zmanjšanja genetske variabilnosti. Rekurentna selekcija je pri žlahtnjenju vrste *B. napus* relativno slabo uveljavljena metoda, ki se sicer uporablja, vendar pa svetovni trend pridelave kakovostnega pridelka z zelenimi lastnostmi narekuje vedno obsežnejšo uporabo genskih transformacij namesto metod klasičnega žlahtnjenja. Vsaka od omenjenih metod ima svoje omejitve. Klasične žlahtniteljske metode so časovno obsežne, s čimer so povezane predvsem finančne posledice teh procesov.

Moška sterilnost rastlin je pomembna s stališča pridobivanja hibridov (kontrola oprasitve), kar je pri samoprašnicah, kot je *B. napus*, še težje. *B. napus* prav tako nima prirojenega sistema gametofitne ali sporofitne samoinkompatibilnosti (SSI), kot ga imajo nekateri njeni sorodniki iz rodu *Brassica*. Vsi ti mehanizmi pa omogočajo kontrolo oprasitve in nekako preprečujejo samooprašitev. Eni izmed pomembnejših lastnosti za lažje pridobivanje hibridov samoprašnic sta tako tudi vnos gena za moško sterilnost in hkratna ohranitev fertilnosti rastline (Black in sod., 2006). Cilj teh postopkov je vnos moško sterilnega (MS) gena vrste *B. napus* v genotipe z različnimi lastnostmi, da bi dobili seme, ki bi bilo moško sterilno in bi hkrati imelo fertilno citoplazmo ter zelene lastnosti, ki jih ima hibridno seme.

B. napus je tudi ena izmed najbolj dostopnih kmetijskih rastlin, ki jo je mogoče izboljšati s pomočjo biotehnoloških metod (Snowdon in sod., 2007). Kot primer so Weber in sod. (2005) navedli pridobivanje dihaploidnih (DH) rastlin prek kulture mikrospor oziroma anter. Glavna prednost teh haploidnih tehnik je hitra fiksacija segregacijskih genotipov, ki

se kaže v nizki frekvenci, kjer recesivni geni kodirajo specifične lastnosti in so v genom vključeni v homozigotnem stanju. Poleg tega kultura mikrospor pospeši žlahtniteljski cikel. Glede na splošno velik odziv genotipov iz vrste *B. napus* na proizvodnjo DH-rastlin je ta tehnika postala uporabna tudi v komercialnih žlahtniteljskih programih, kar se kaže v velikem številu vpisanih sort.

Poleg haploidnih tehnik se usmerjena križanja izvajajo tudi z uporabo *in vitro* reševanja embria in fuzije protoplastov, kar ustvarja novo genetsko variabilnost oziroma omogoča vnos zelene dednine iz divjih sorodnikov v kratkem času. V primerih, ko konvencionalne tehnike niso učinkovite, pa so mogoča izboljšanja genotipov z uporabo genetskega inženiringa (Snowdon in sod., 2007) (podrobnejši opis v točki 2.1.5).

2.1.3.3 Pridobivanje hibridnega semena

Spolno razmnoževanje organizmov služi zagotavljanju vzdrževanja vrst in znotraj njih zagotavlja višjo stopnjo genetske variabilnosti potomcev prek rekombinacij. Evolucijsko gledano je prilagoditveni potencial pri medsebojnem križanju mnogo večji kot pri potomcih, ki izvirajo iz samooprašitve. Mnoge rastline so zato razvile različne mehanizme, ki favorizirajo medsebojno križanje. Eden izmed takih mehanizmov je tudi samoinkompatibilnost (SI), ki je značilna za družino križnic (Brassicaceae). Omenjeni mehanizem je pomemben pri preprečevanju samooprašitve križnic in zato uporaben tudi za žlahtnitelje. Lastnost SI je genetsko kontrolirana z enim polimorfnim lokusom, imenovanim S-lokus, katerega evolucijo združujeta rodova *Arabidopsis* in *Brassica* (McCubbin in Kao, 1996). SI-sisteme generalno razdelimo v heteromorfne in homomorfne tipe. Pri heteromornih tipih imajo cvetovi enake vrste dve ali tri različne morfološke oblike, zato je uspešna oprasitev možna le med različnimi morfološkimi oblikami cvetov. SI pri homomornih cvetovih (vsi cvetovi imajo enako strukturo; preprečevanje samooprašitve je odvisno od genetskih in biokemičnih mehanizmov) pa se deli glede na lastnosti v primerih sporofitno ali gametofitno kontrolirane zavrnitve peloda (McCubbin in Kao, 1996). SI je opredeljena kot nesposobnost fertilne dvospolne rastline, kjer po samooprašitvi cvetni prah ne more oploditi spolne celice in tvoriti zigote. SI je gensko izražena lastnost, ki je zelo razširjena pri cvetnicah. Znanih je več ko 66 rastlinskih družin (predstavljajo velik delež kritosemenk) s to lastnostjo. Zaradi nje se je povečala sposobnost osebkov za prenašanje selekcijskih pritiskov, kar je posledično prispevalo k povečanemu evolucijskemu potencialu vrst. Poleg pomena za evolucijo ima SI pomen predvsem v žlahtnjenju rastlin in v kmetijstvu. Žlahtnitelju ta lastnost predstavlja dva nasprotujoča si vidika. Preprečuje namreč pridobivanje homozigotnih linij (ponavljajoče se samoopraševanje, ki v F6-generaciji privede do skoraj popolne homozigotnosti), hkrati pa zagotavlja enostaven mehanizem za pridobivanje hibridnega semena rastlin brez sterilizacije ženske starševske rastline.

SSI-aleli iz 2n-vrst (*B. rapa* ali *B. oleracea*) so prisotni tudi pri *B. napus* (4n) in služijo regulaciji oprasitve pri štirilinijski hibridni produkciji. Štirilinijska hibridna shema za pridobivanje hibridov z uporabo SSI pri *B. napus* vključuje štiri SSI-allele (S_1 , S_2 , S_3 , S_4). Ta križanja so opravljena z mešanjem semena in vzgojo obeh komponent skupaj na polju. Metoda omogoča pridobiti obsežne količine hibridnega semena, saj je vsaka v tem posevku donor peloda in hkrati proizvajalec semena (Black in sod., 2006).

Poleg tega obstajajo tudi druge metode za pridobivanje hibridnega semena pri *B. napus*. Jedrna moška sterilnost (angl. Nuclear Male Sterility – NMS) deluje po sistemu sterilnosti moškega starša hibrida. V genetsko spremenjeni verziji NMS-sistema je starš, ki proizvaja cvetni prah, s polja odstranjen z uporabo herbicida za celoten posevek, saj moško sterilni konstrukt vsebuje tudi gen za odpornost na herbicid (Black in sod., 2006).

Citoplazemska moška sterilnost (CMS) je naravna lastnost, ki preprečuje produkcijo peloda, ki bi bilo sposobno oprašitve. Pri pridobivanju hibridov samoprašnic je to zelo uporabna lastnost, ki so jo odkrili že pred 60 leti pri čebuli. Gre za to, da žlahtnitelj najde vir CMS, to lastnost s povratnim križanjem vnese v izbrano starševko linijo, ki potem ne more oprašiti sama sebe z lastnim cvetnim prahom, hkrati pa je ta rastlina fertilna in jo lahko opraši cvetni prah drugega izbranega starša (Black in sod., 2006). Podrobne molekularne SSI-analize so pokazale, da je S-lokus sestavljen iz različnih in izrazitih polialelnih genov. Ta multigenski kompleks na S-lokusu se pogosto deduje skupaj, torej kot ena enota, in zato v literaturi S-alele imenujejo kar S-haplotipi (Boyce in Nasrallah, 1993). S-lokus vključuje enosmerni transmembranski rastlinski kinazni receptor (angl. S-lokus receptor kinase – SRK) (Stein in sod., 1991), ki deluje v papilarnih celicah stigme, in s cisteinom bogat peptid (angl. S-lokus cysteine-rich – SCR) (Schopfer in sod., 1999), ki je lociran na plašču peloda. Ti dve komponenti delujeta v SSI-sistemu kot kompleks ligand–receptor. V osnovi samooprašitve naj bi se SCR-peptid tvoril na površini stigme, kjer bi interaktivno deloval z ektodomeno SRK (S-domena). Ta interakcija naj bi takrat sprožila signalno večstopenjsko reakcijo, ki rezultira inhibicijo samooprašitve in prepreči tvorbo pelodne cevi (Kachroo, 2002).

2.1.4 Molekulska evolucija pri rodovih *Arabidopsis* in *Brassica* znotraj družine Brassicaceae

V tej točki smo se omejili na molekulsko evolucijo genov, ki se nahajajo na S-lokusu, in sicer pri SSI-sistemu, ki je značilen za Brassicaceae. Največ znanega o modelnih rastlinah za tovrstne analize je predvsem pri rodovih *Arabidopsis* in *Brassica*. Iz rodu *Arabidopsis* nam je najbolj znan navadni repnjakovec (*A. thaliana*), ki se zaradi svojega majhnega genoma uporablja kot modelna rastlina v večini genetskih raziskav. Njemu soroden je *A. lyrata*, ki naj bi se iz vrste *A. thaliana* razvil pred petimi milijoni let. Kljub izjemni podobnosti med obema sorodnikoma ima *A. lyrata* osem kromosomov in 230 Mb velik genom, medtem ko ima *A. thaliana* pet kromosomov in 125 Mb velik genom. Biološko se razlikujeta v tem, da je *A. thaliana* sporofitno kompatibilen (tako kot vrsta *B. napus*), *A. lyrata* pa ne (Fobis-Loisy in sod., 2004), in zato smo ga primerjalno (kot SSI-predstavnik rodu *Arabidopsis*) z rodом *Brassica* vključili v pregled objav. *A. lyrata* je pri nas manj znana rastlina, saj je tudi Mala flora Slovenije (Martinčič in sod., 2007) ne navaja. Primer razvoja SSI znotraj družine Brassicaceae bi lahko bil orientacijski za molekulsko evolucijo lastnosti, ki jih kodirajo geni, ki se v naravi prek spontanega križanja prenašajo med vrsto *B. napus* in njenimi SKS-ji.

V družini Brassicaceae je SI kontrolirana sporofitsko, z enim samim, visoko polimorfnim lokusom (S-lokus). Zavrnitev peloda je dosežena, ko se hkrati na enakem S-lokusu alel izrazi tako po materini kot tudi po očetovski strani. Število S-alelov je običajno visoko, več

kot 90 pri *B. oleracea*, 30 pri *B. rapa* in 34 pri rodu *Raphanus*, pri *A. lyrata* pa je bilo do sedaj določenih le 12 alelov (Fobis-Loisy in sod., 2004). Citološke študije pri družini Brassicaceae so pokazale na zgodnjo inhibicijo inkompatibilnega peloda. Že Bateman (1955) je pokazal, da je SSI determinirana s sistemom alelov na polimorfem S-lokusu. Nedavna karakterizacija SSI-sistema pri *A. lyrata* (naravno križanje nekultiviranih rastlin z daljnimi sorodniki rodu *Brassica*) je vodila v raziskave molekularnih in genetskih osnov homolognosti SSI-sistema pri Brassicaceae. Ugotovljeno je bilo, da je SSI-sistem pri *A. lyrata* enak ostalim križnicam, saj njegovo citološko manifestacijo zavrnitve peloda in sporofitno kontrolo uravnava en sam lokus. Analiza dveh *A. lyrata* S-haplotipov je pokazala, da S-lokus pri *A. lyrata* vsebuje dva povezana ortologa z rodом *Brassica*, in sicer SRK- in SCR-gene. Taka ugotovitev nakazuje na starodaven in monofiletski izvor SSI-sistema pri križnicah. Tudi karakterizacija 11 aditivnih SRK-alelov pri *A. lyrata* v primerjavi z *Brassica* ortologi je pokazala izredno ohranjenost med obema rodovoma (Schierup in sod., 2001). Zaznali so kar 12 ohranjenih cisteinskih ostankov v vseh SRK-alelih. SCR-aleli so v primerjavi z njimi bolj divergentni, saj je enakost med aleli znotraj vsake vrste na nivoju aminokislin le 30-odstotna, medtem ko je enakost pri SRK-alelih do 40-odstotna (Kusaba in sod., 2001).

Pri večini *Brassica* S-haplotipov S-lokus vsebuje še tretji polimorfni gen, imenovan SLG, ki je tesno povezan s SRK- in SCR-geni. SLG-gen kodira S-lokus glikoprotein (SLG; tudi starejši izraz SLG – S-lokusno specifičen protein), ki je podoben ekstralcelularni domeni SRK, oba pa prikazujeta razvojno enake vzorce izražanja. Zanimivo je tudi dejstvo, da SLG-gena niso našli pri *A. lyrata* (Silva in sod., 2001).

Naslednja različnost med rastlinami iz rodu *Brassica* in *A. lyrata* je ta, da se lahko *Brassica* haplotipi značilno razdelijo v dve skupini, imenovani razred I in razred II. Ta dva razreda sta bila prvič oblikovana na osnovi sekvenčne enakosti v SLG-genu, kasneje pa sta bila dopolnjena in potrjena še na podlagi znanih sekvenc SRK- in SRC-genov (Shiba in sod., 2002). Zanimivo je, da obstaja korelacija med haplotipom razreda in SSI-fenotipom: haplotipi razreda I so naravnani k dominantnosti, haplotipi razreda II pa k recesivnosti v pelodu. Pri *A. lyrata* tako značilne delitve na omenjena razreda ni (Kusaba in sod., 2001).

Konec koncev se različnost med *Brassica* in *A. lyrata* nanaša na prisotnost/odsotnost SLG-gena in na obstoj dveh razredov S-haplotipov, kar močno napeljuje na dejstvo, da se je SSI po omenjenih linijah *Brassica* in *A. lyrata* razvijala različno. To potrjuje tudi študija Sakamota in sod. (1998). S primerjavo štirih SSI-okrasnih rastlin iz družine Brassicaceae so avtorji omenjene študije identificirali (razred I in razred II) SLG-gene v tesni povezavi z rastlinami iz rodu *Brassica*, *R. sativus*, vendar ne pri tistih treh rastlinah, ki so bolj oddaljeno povezane z rodом *Brassica* kot z rodом *Raphanus*. Zanimivo je, da se je ena od teh (*Cherianthus cheiri*) skupaj z rodом *Arabidopsis* znašla v filogenetskem drevesu Brassicaceae, ki je bilo izdelano na osnovi nukleotidnih sekvenc SLR1-gena (Inaba in Nishio, 2002). Dodatna evidenca za divergentnost SSI v najmanj dveh linijah pa je objavljena v delu Nasrallaha in sod., (2002), saj jim je uspelo potrditi SSI-specifično samokompatibilnost pri *A. thaliana* s transformacijo *A. lyrata* SRK- in SCR-genov.

Divergenca SSI med *A. lyrata* in vrstami iz rodu *Brassica* vodi v situacijo, kjer se postavlja vprašanje, katera je bila podedovana struktura S-lokus kompleksa pri Brassicaceae. Obstaja

hipoteza, ki pravi, da je bil predniški S-lokus sestavljen iz treh SSI-determinantnih genov: SRK, SLG in SCR. Po ločitvi rodov *Arabidopsis* in *Brassica* se je SLG-gen pri rodu *Arabidopsis* izgubil, medtem ko se je pri rodu *Brassica* ohranil. Po tej poti naj bi se SLG-gen v času evolucije večkrat izgubil: ob ločitvi rodov *Arabidopsis* in *Brassica* ter posledično med diverzifikacijo rodu *Brassica*, saj tudi nekatere vrste tega rodu ne vsebujejo SLG-gena. Po tej ponavljajoči se izgubi SLG-gena si ni mogoče predstavljati, da je predniški S-lokusni kompleks vseboval le SRK- in SCR-gene (Sato in sod., 2002).

Z vidika evlucijskega razvoja polimorfnosti SRK- in SCR-genov je smiselno pričakovati nekatere povezave skozi časovno obdobje med obema linijama. Visoka stopnja alelnega polimorfizma je konsistentna s pričakovanjem, da imajo redki S-aleli selektivno prednost. V pelodnih zrnih so izraženi redki aleli, ki lahko oprašijo višjo frakcijo populacije kot eden skupno ohranjen alel. Ta prednost se je zreducirala takrat, ko so se omenjeni aleli v populaciji fiksirali in obdržali. Skozi proces omenjene pogostnostno odvisne selekcije je bila S-alelom preprečena izguba zaradi naključnega genetskega zdrsa (angl. genetic drift) in nove S-lokusne specifikacije so se v populacijah ohranile zelo dolgo časa. Ker pa so se S-aleli obdržali v populaciji v zelo dolgih obdobjih, so se na S-lokusnih genih kopičile naravne mutacije, naraščala pa je tudi raznolikost med sekvencami in zato so bila prepoznavna mesta skrita oziroma neznana (Miege in sod., 2001).

Veliko študij o evlucijskem razvoju SSI je bilo narejenih na rastlinah iz rodu *Brassica*, saj so bile te rastline dolga leta najbolj uporabni modelni organizmi za tovrstne analize. Primerjava raznolikosti SLG-, SRK- in SCR-alelov iz dveh vrst, *B. oleracea* in *B. rapa*, je zato v večini primerov pokazala tako imenovani transspecifični polimorfizem, saj gre za večjo podobnost alelov med vrstami kot znotraj vrste (Shiba in sod., 2002). V zadnjih študijah pa ugotavljajo, da se je specifična prepoznavanja pokazala šele po speciaciji *B. oleracea/B. rapa*, kar je pripomoglo k transspecifični evoluciji (Kimura in sod., 2002). Razvoj polimorfnosti S-alelov naj bi se zgodil pred približno 20–40 milijoni let, medtem ko naj bi se speciacija rodu *Brassica* dogajala pred 5–10 milijoni let (Uyenoyama, 1995).

Na osnovi zgornjih navedb lahko sklepamo, da je S-lokus dinamičen lokus. Edh in sod. (2009) navajajo, da je skupni set S-haplotipov prisoten znotraj genoma prednika rodov *Brassica* in *Arabidopsis* ter da se je le majhno število haplotipov ohranilo znotraj rodu *Brassica* po diverzifikaciji obeh rodovnih linij.

2.1.5 Transgene rastline

Z razvojem biotehnoloških metod so klasične metode žlahtnjenja dopolnile metode genskega inženiringa tudi pri vrsti *B. napus*, kar pomeni potencialno tveganje za vnos gensko spremenjenih organizmov v slovenski pridelovalni prostor; v Sloveniji je bil Zakon o soobstoju gensko spremenjenih rastlin z ostalimi kmetijskimi rastlinami sprejet v letu 2009. Gensko spremenjene poljščine se pri nas še ne pridelujejo, poleg tega tudi gensko spremenjene sorte še niso vključene v poljske poskuse (Šuštar Vozlič in sod., 2010).

V odvisnosti od genotipa in specifičnih dejavnikov okolja v naravi lahko prihaja do prenosa genov znotraj vrste *B. napus*, in sicer med rastlinami različnih habitatov (Friedt in Snowdon, 2009). Možnost uvajanja gensko spremenjenih organizmov v kmetijsko prakso

bi zato lahko vplivala na spremembe v agroekosistemu, njihova prisotnost pa lahko vpliva na rast ostalih poljščin in povzroči nenamerno pojavnost transgenih rastlin izven pridelovalnih površin ter v opraševalnih relacijah kot vir transgenov. Vrsta *B. napus* je zato tudi modelna vrsta za izvajanje ocene prenosa genov iz transgenih rastlin na netransgene rastline med posevki in izven njih (Crawley in Brown, 2004; Ramsay in sod., 2003), saj je znana predvsem po podivjanih populacijah, ki so najbolj pogoste ob transportnih poteh in robovih njiv (Charters in sod., 1999). Z vnosom genetsko spremenjenih rastlin v kmetijsko produkcijo je postal pretok genov s pelodom predmet številnih raziskav. Eden od ciljev teh raziskav je ocena potencialnega tveganja sproščanja gensko spremenjenih rastlin v okolje in zagotovitev soobstoja različnih kmetijskih praks. Področje paše pri čebelah in čmrljih se močno razlikuje ne le med vrstami in različnimi habitatmi, temveč tudi med posameznimi genotipi iste vrste. Opažene dolge pašne razdalje so pri medonosni čebeli segale 6–10 kilometrov od čebelnjaka (Ramsay in sod., 2003).

Sedanji čas je za slovenske pridelovalne razmere tudi svojevrstna prelomnica, saj se odločamo o možnostih pridelave gensko spremenjenih rastlin ter o soobstoju teh s konvencionalnim in ekološkim načinom pridelave tudi za vrsto *B. napus*. Možnost uvajanja gensko spremenjene oljne ogrščice v slovenske sisteme pridelave bo posledično v pridelovalni prostor prinesla tudi nove opraševalne vire s transgenimi lastnostmi, ki bodo posredno ali neposredno vplivali na opraševalne odnose. Rezultati teh odnosov se bodo kasneje izražali v kakovosti pridelka in v deležu nenamerne prisotnosti gensko spremenjenih organizmov v zrnju.

O temi nenadzorovanega pojavljanja rastlin vrste *B. napus* (plevelne in podivjane rastline) ob transportni infrastrukturi so nedavno poročali tudi Sagers in sod. (2010), ki opisujejo prisotnost transgenov (za toleranco na herbicide) v podivjanih populacijah vrste *B. napus* zaradi nenadzorovanih križanj v Severni Dakoti. V poročilu je izpostavljena predvsem velika verjetnost prenosa genov med SKS-ji vrste *B. napus* izven pridelovalnih okvirjev, prav tako pa so izpostavljene tudi globalne posledice takih križanj za pridelovalce, uporabnike in okolje. S strani mreže evropskih GS-inšpektorjev smo v marcu leta 2012 prejeli sporočilo o pojavu gensko spremenjenih organizmov v naravi. Šlo je za podivjano gensko spremenjeno rastlino vrste *B. napus*, ki so jo našli v bližini železniške postaje Lugano v Švici. Ob tem je treba omeniti, da Švica spada v skupino držav, kjer se gensko spremenjeni organizmi ne pridelujejo (angl. GSO free zone).

Komercialno sproščanje gensko spremenjenih poljščin vzbuja pozornost predvsem z vidika naturalizacije, vključevanja transgenov v SKS-je ter prenosa koristnih lastnosti v native in plevelne vrste prek spontanega križanja. Gensko spremenjeni organizmi vrste *B. napus* v svetu najpogosteje vključujejo lastnosti tolerance na herbicide, kot sta glifosat in glufosinat, ki sta največkrat vključena v 'Canola' kultivarje (Schafer in sod., 2011). Squire in sod. (2011) navajajo, da podivjane populacije vrste *B. napus* niso relevanten vir makroskopske nečistosti v pridelovalnem prostoru, temveč predstavljajo možnost za genetske rekombinacije, vključevanje transgenov in evolucijo genotipov, ki bi se pod močnim selekcijskim pritiskom lahko razširile na pridelovalna območja in s tem predstavljala ekonomsko plevelno breme.

2.1.6 Ohranjanje semena v talni semenski banki

Talne semenske banke so naravno skladišče semen v tleh za številne rastlinske vrste. Imajo pomembno vlogo pri dinamiki vegetacije, še posebej ob različnih oblikah motenj v naravi ali ob destrukcijah habitatov (požari, goloseki, (pre)intenzivna paša, erozija, oranje), saj lahko rastlinske vrste, katerih seme je že v tleh, hitro kolonizirajo nastali prostor. Vrstna sestava in dolgoživost semen v tleh vplivata na hitrost obnove habitata, njegovo vrstno sestavo, proizvodnost in ekološko vrednost. Talna semenska banka je skupno ime za shranjevanje semena, ki je pogosto dormantno in se v tleh nahaja v različnih kopenskih ekosistemih (Csontos, 2007). Talne semenske banke za posamezne vrste se razlikujejo glede na dolžino obstojnosti in ohranjanja kalivosti semen v tleh, kar pomeni, da je prisotnost nekaterih semen v tleh le začasna in se potencial talne semenske banke izčrpa v naslednjem vegetacijskem obdobju. V tleh se nahajajo tudi semena rastlin, ki so vitalna in sposobna reprodukcije tudi po nekaj letih shranjevanja v tleh (v glavnem so to predstavniki plevelnih vrst); med njih spada *Chenopodium album* (bela metlika), v primerih samosevnega in podivjanega pojavljanja pa tudi *B. napus*. Obstajajo pa tudi semena rastlin, ki se v tleh sploh ne ohranjajo (razen v sušnem obdobju med zrelostjo in med prvimi jesenskimi padavinami); tak primer je *Agrostemma githago* (navadni kokalj) (Strokovni predlog ..., 2009), ki je v Sloveniji uvrščen na rdeči seznam rastlinskih vrst.

Talna semenska banka ima pomembno vlogo v različnih ekosistemih, saj pomeni izvor semena za hitro obnavljanje degradiranih površin, ki so lahko posledica naravnih nesreč ali človeške aktivnosti v določenem ekosistemu. Vsako seme, ki ni odstranjeno iz polja v času žetve ali ostane na polju, postane del talne semenske banke, kjer je nato izpostavljeno različnim vplivom v tleh, ki pogojujejo naslednja stanja semena: neposredna kalitev, doba dormance (mirovanja), ki ji sledi kalitev, datiranje, napad mikrobov in propad semena.

2.1.6.1 Dormantnost semena

Dormantnost semena je opredeljena kot nesposobnost kalitve semena, ki je sicer sposobno za življenje, vendar pod določenimi optimalnimi pogoji. Ločimo primarno in sekundarno dormanco. Slednja je bila dokazana na evropskih genotipih vrste *B. napus* (Schlink, 1994). Primarna dormanca opredeljuje stanje semena, kjer je kalitev potomcev onemogočena, vse dokler seme ne dozori na starševski rastlini in še nekaj časa po tem, ko je ločeno od matične rastline. Obdobje do popolne razvitosti semena (fiziološki zrelosti) je pogosto skrajšano s primarno dormanco. Sekundarna dormanca pa je opredeljena kot zmanjšanje kalivosti semena, ki se razvije po raztrositvi in lahko v določenih primerih prednostno vpliva na hitrejše skrajšanje primarne dormance (Baskin in Baskin, 1998).

Dormantnost pri vrsti *B. napus* je v glavnem inducirana prek določenih temperaturnih in vodnih razmer. Inducirana ali sekundarna dormanca po podatkih raziskav ni pogojena z izpostavljenostjo semena normalnim temperaturam – 15–20 °C (Schlink, 1994). Na podlagi študij, ki so jih izvedli Perkun in sod. (1997 in 1998), Marshall in sod. (2000) ter Squire (1997, 1999), je razvidno, da so za večino sort pogoji, ki inducirajo dormanco, predvsem nizke temperature, sušne razmere ali tema. Iz navedenega izhaja trditev, da je pojavnost podivjanih populacij odvisna tudi od genetskih preddispozicij semena in ne samo od razmer *in vivo*.

Podrazdelitev sistema dormantnosti semena je opredeljena s stopnjo dormance, pri čemer sta tako primarna kot sekundarna dormanca lahko pogojni (inducirani zaradi specifičnih okoljskih dejavnikov) ali prirojeni (genetsko določeni) (Baskin in Baskin, 1985). Za razliko od nedormantnega semena pogojno dormantno seme kali pod vplivom omejenega števila specifičnih optimalnih dejavnikov, medtem ko seme s prirojeno dormanco ne kali v nobenih okoljskih pogojih, četudi so še tako optimalni. Baskin in Baskin (1985) navajata, da lahko seme v tleh prehaja iz stanja nedormance v stanje pogojne sekundarne dormance, iz nje v naravno (prirojeno) sekundarno dormanco in nato nazaj v nedormantno stanje za kratko obdobje znotraj enega leta. Ta krog se lahko ponavlja iz leta v leto v katerem koli semenu v talni semenski banki in služi kot blažilni mehanizem proti hitri genetski adaptaciji (genetski zastanek), s čimer se prepreči prilagoditev na specifične pogoje v kratkih obdobjih vegetacije enoletnih rastlin. Sinhronizacija tega cikla je pod velikim vplivom temperature (Probert, 2000), življenjski krog pa je odvisen tudi od vrste (jara, ozimna).

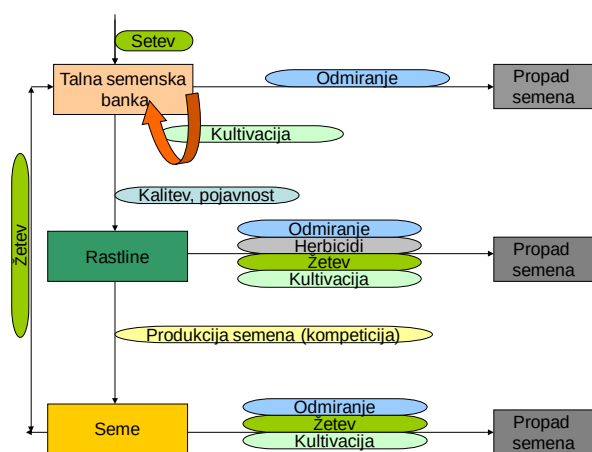
Poročil o primarni dormanci pri vrsti *B. napus* je kar nekaj, vendar so zaključki pri vseh zelo dvomljivi in nedorečeni. Nizka kalivost pri ozimni in jari obliki obstaja izjemoma med dozorevanjem semena ter pada z njegovo naraščajočo zrelostjo (Schlink, 1994). Primarna dormanca pri ozimni obliki je med 10 in 20 % (Perkun in Lutman, 1998), pri nekaterih genotipih pa je med osmimi in dvanajstimi tedni po cvetenju lahko zastopana tudi v 60 % semena. Po žetvi primarna dormanca ni več prisotna (Schlink, 1994). Četudi ima primarna dormanca malenkostno vlogo pri celotno dozorelem semenu, seme vrste *B. napus* lahko razvije tudi sekundarno dormanco.

2.1.6.2 Samoohranjanje semen v tleh

Seme, ki je prisotno v tleh, lahko kali, lahko postane hrana talnim organizmom ali pa ga začnejo razgrajevati saprofitni organizmi, lahko pa tudi samo od sebe propade. Veliko poskusov so na temo sposobnosti ohranjanja v tleh in kalitve teh semen izvedli pri rodu *Brassica* ter tudi pri ostalih sorodnikih vrste *B. napus* iz družine Brassicaceae, kjer so seme vrste *B. napus* posejali po različnih setvenih metodah, vendar se kljub temu, da so semena kalila, rastlinice niso pojavile na površini (semena niso prodrla skozi površinsko plast šote). Seme vrste *B. napus* ostane v tleh kalivo tudi do 16 let, v nekaterih primerih pa tudi le eno leto. Ko so primerjali kalivost gensko spremenjenega in gensko nespremenjenega semena, so ugotovili le majhno razliko v njegovi dolgoživosti. SKS-ja, natančneje *B. rapa* in *Hirschfelda incana*, pa sta v glavnem zastopana v večjih odstotkih kot ostali. Na podlagi zgornjih ugotovitev Squire in Begg (2003) navajata, da večina semena rastlin iz rodu *Brassica*, ki se nahaja v talni semenski banki, hitro propade. Le manjši del semen (manj kot 1 %) v tleh postane dormanten in živ ter sposoben kalitve čez več let, še posebej če se nahaja na globini 15–20 cm. Dolgoživost je odvisna od sorte in pogojev v tleh.

Ob primernem času, ko rastline začnejo semeniti in se življenjski krog zaključuje, se zaradi stresanja semen iz luskov samosevnih rastlin začne tudi talna semenska banka dopolnjevati in obnavljati s semeni samosevne vrste *B. napus* v tekočem letu. V vzhodni Kanadi, kjer posamezne samosevne rastline preživijo zimo, lahko obogatijo talno semensko banko tudi z do 3000 semeni (Simard in sod., 2002). Tako se življenjski krog dokončno zaključi s

sproščanjem semen v tla, s tem pa se razširi dolžina življenjskega kroga, ki vključuje tudi izčrpavanje in dopolnitev semena v tleh iz leta v leto. Če je življenjski krog končan, preden je v celoti izčrpan potencial talne semenske banke, obseg podivjanih (samoohranjenih) populacij naraste (Stump in Westra, 2000) (slika 3). Prisotnost podivjane ozimne oblike (rastline izven pridelovalnih površin) je bila proučevana tudi v več državah Evrope. Po navedbah Crawleyja in Browna (1995) je prisotnost ozimne oblike v Združenem kraljestvu nizka in te populacije v zadnjih nekaj letih izginjajo. Avtorja med drugim navajata, da so transgeni kultivarji manj trdovratni kot netransgene linije. V Franciji podivjane ozimne oblike ostanejo v tleh ob transportnih poteh kalive tudi do osem let (Pessel in sod., 2001).



Slika 3: Strukturni model ohranjanja semena v talni semenski banki (Squire in sod., 2003)

Prikazuje povezave med fazami v življenjskem krogu (zgornji del sheme) ter med življenjsko zgodovino in pridelovalnim procesom (nižji del sheme).

Figure 3: Structural model of self-recruited seed in soil seed bank (Squire et al., 2003)

which represents the linkage between different phases in life cycle (upper part of the sheme) and between life history and production process (lower part of the sheme).

Prvotne poti vstopa semen v talno semensko banko so bile prek izgub semena ob žetvi, o čemer je znanega veliko, vendar zelo specifično usmerjenega znanja, ki le redko zajema izgube ob žetvi sami (naravno izgubljeno seme in strojne izgube). V Združenem kraljestvu neposredne izgube ob žetvi ozimne oblike v optimalnih pogojih spravila znašajo 2–5 % pridelka, v primeru neugodnih razmer pa lahko ob spravilu pride tudi do 50-odstotnih izgub (Price in sod., 1996). Nekaterе študije navajajo, da je časovno usklajevanje žetvenih dejavnosti s stališča minimaliziranja izgub pomembnejše kot žetvena tehnika (Price in sod., 1996). Zhu in sod. (2012) so ugotovili, da se kar tri četrtine vseh izgub semena vrste *B. napus* zgodi v času žetve in da te izgube znašajo 0,7–1,1 % teže celotnega pridelka. To seme nato preide v talno semensko banko znotraj pridelovalne površine. Dokazali so, da če je nato ta pridelovalna površina kakor koli obdelana, da se niti v treh mesecih po vnosu v tla samosevne rastline ne pojavijo. Prav tako so ugotovili, da globina nahajanja semena v tleh ne vpliva na kalitev (Zhu in sod., 2012).

2.1.6.3 Dejavniki, ki vplivajo na kalivost semen vrste *B. napus* v tleh

Splošno znano dejstvo je, da različne kombinacije kompleksnih dejavnikov vplivajo na kalitev semena v tleh. Prepletajo se vplivi lastnosti tal, specifične talne razmere in klimatski dejavniki, prisotnost rastlinskih hormonov v semenu ter agrotehnični ukrepi. Tako veliko število vplivov pa seveda potencira možnosti napovedi pojavnosti rastlin, ki izvirajo iz talne semenske banke. Sinergistični in antagonistični vplivi kombinacij dejavnikov iz različnih okolij biosfere vključujejo nepredvidljivo dinamiko pojavljanja rastlin iz talne semenske banke. V osnovi pa so zgoraj naštetih dejavnikov v naravnem okolju spremenljivi, njihov vpliv pa je odvisen tudi od genotipa semena v talni semenski banki in od njegovih bioloških lastnosti.

Na podlagi navedb López-Granadosa in Lutmana (1998) je znano, da tekstura tal pomembno vpliva na prisotnost in dolgoživost semen v tleh. V muljasti ilovici je namreč tendenca semen ozimnih genotipov za obstoj višja kot na peščenih tleh (podatki so povzeti iz študije, opravljene v Združenem kraljestvu). Na indukcijo sekundarne dormance in s tem na skrajšanje prisotnosti semen v tleh (hitrejša kalitev) vplivajo različni talni dejavniki. Pri poskusih so kombinacije teme in nizkih koncentracij kisika (3 % kisika in 97 % dušika) inducirale sekundarno dormanco, vendar v nižji stopnji kot vpliv kombinacije osmotskega stresa in teme (Momoh, 2002).

Raziskave pa potekajo tudi na področju vpliva temperature na kalitev semen v tleh. Na podlagi temperaturne razlike med začetno temperaturo za sekundarno dormanco in testno temperaturo, ki je bila potrebna za kalitev, so proučevali razvoj sekundarne dormance. Ugotovili so, da čim večja je bila absolutna temperaturna razlika, manj je vplivala na sekundarno dormanco semena v tleh (Momoh, 2002). Pri ozimni obliki je sicer potrebno obdobje nizkih temperatur za nemoten potek kasnejših fenofaz (cvetenja), vendar v času kalitve semena nizke temperature sicer inducirajo kalitev, a imajo take rastline zelo šibek rastni vigor (Larsen in sod., 1998). Ugotavljali so tudi vplive konstantnega osvetljevanja z bliskavico fotoaparata. S pomočjo konstantne svetlobe dormantnega semena so dosegli skupno 98,1-odstotno kalivost teh semen (Schlink, 1994). Izpostavljenost beli svetlobi pri nizkih temperaturah in v kombinaciji z vodnim stresom pa naj bi po podatkih Schlinka (1995) inhibirala kalitev semen v tleh.

Za biosintezo posameznih rastlinskih hormonov, ki so vključeni v regulacijo procesov v dormantnih stanjih semena, stojijo kompleksne encimske reakcije. Perkun in sod. (1998b) so uporabili eksogeno giberelinsko kislino ($0,2 \text{ mg/l}^{-1}$) in dokazali, da je njena prisotnost nasprotujoča sekundarni dormanci semena. Tudi abscizinska kislina (ABA) je bila pri rastlinah dokazana kot pomemben element različnih odzivov rastline v različnih stanjih, tudi v dormanci. Poskusi so vključevali aplikacijo eksogenih hormonov ABA in giberelinov na seme, kar je posledično privedlo do antagonističnega učinka med tema dvema rastnima rastlinskima hormonoma. Velika razmerja ABA–giberelini pomenijo pospeševanje dormance, nizka razmerja teh dveh rastnih hormonov pa vodijo v končno kalitev semena (Waring in Saunders, 1971). Vloga ABA-hormona pri dormanci semena je bila dokazana pri različnih rastlinskih vrstah, fluridon, znan kot biosintezni inhibitor ABA, pa tako kot eksogena giberelinska kislina omogoča učinkovito prekinitev dormantnosti semena (Grappin in sod., 2000). Za ABA je znano, da je največja koncentracija tega

hormona v semenu prav v času njegovega dozorevanja, zmanjševati pa se začne z izsuševanjem semena (Juricic in sod., 1995).

Zasip semena v tla prav tako bogati talno semensko banko vrste *B. napus*, enako pa velja tudi za plevelne rastline. Evropske študije so pokazale, da je bilo na zemljiščih, ki so jih takoj po žetvi preorali, naslednje leto vzkaljenih kar 30 % rastlin vrste *B. napus* iz talne semenske banke, kjer je seme prezimilo. Samo 0,1 % rastlin pa je naslednje leto vzklilo na zemljiščih, kjer po žetvi niso obdelali tal, temveč so izgubljeno seme pustili na površini tal (Perkun in Lutman, 1998). Gruber in sod. (2010) so ugotovili, da je bolj kot globina obdelave tal pomemben termin obdelave. Na podlagi teh ugotovitev lahko trdimo, da je s pomočjo različnih agrotehničnih ukrepov mogoče regulirati obseg talne semenske banke na pridelovalnih površinah. V Sloveniji se v praksi izvaja podoben sistem, kot je opisan zgoraj. Zlasti v intenzivnem načinu pridelave kmetje takoj po žetvi tal ne obdelajo, temveč pustijo, da izgubljeno seme na površini tal vzkali, s čimer se izrabi potencial izgubljenega semena, in potem te mlade rastline v vegetativni fazi bodisi zaorjejo ali pokosijo za krmo, lahko pa jih uničijo tudi s kemičnimi pripravki (totalni herbicid). S tem načinom preprečijo pojav samosevcev v posevku, ki se bo v naslednjem letu prideloval na isti površini. Z oranjem spreminjamo mikroklimatske dejavnike v rizosferi in s tem vplivamo tudi na semena v talni semenski banki, ki izvirajo predvsem iz plevelnih rastlin. Sprememba trenutnih mikroklimatskih dejavnikov v tleh pa posredno vpliva na kalitev semen. Ob oranju se zaradi obračanja plasti in prezračevanja tal spremeni plinska sestava v rizosferi (CO_2 , O_2), prihaja pa tudi do povečane vsebnosti organske snovi, zaradi česar se spremenijo tudi procesi v tleh. Ob vsem tem se spreminja tudi temperatura (Probert, 2000).

2.1.6.4 Simulacijski modeli dinamike pojavljanja rastlin vrste *B. napus* iz talne semenske banke

Napovedovanje dinamike pojavljanja tako samosevnih kot podivjanih rastlin vrste *B. napus* predstavlja nadgradnjo in povezovanje vsega dosedanjega znanja o genetskih, bioloških, agrotehničnih, klimatoloških, pedoloških in geografskih področjih, ki neposredno in posredno vplivajo na ohranjanje semena v naravnih in polnaravnih habitatih. Prav zato povezane skupine strokovnjakov iz vseh omenjenih področij zadnja leta poskušajo vse te dejavnike vključiti v model, ki bo s pomočjo dejanskih podatkov s terena poskušal napovedati kratkoročno in dolgoročno pojavnost rastlin vrste *B. napus* v prostoru. Ti modeli pa bodo z dopolnjenimi podatki karakteristik transgenih rastlin uporabni tudi v primeru soobstoja gensko spremenjene in gensko nespremenjene pridelave v določenem prostoru.

Garnier in Lecomte (2006) sta razvila invazivni model, ki združuje stopnjo strukturne dinamike pojavnosti rastlin (prek tranzitnih poti) z izgubo semena (raztrošeno zrnje), kar omogoča osnovo za strukturno stopnjo integrirano različnih modelov, ki sta jih razvila Neubert in Caswell (2000). Vsekakor se ob tem pojavi potreba po simulaciji pojavnosti rastlin vrste *B. napus* v naravi ter po vrednotenju njene invazivnosti na prostorskem in časovnem nivoju. Middelhoff in Breckling (2003) sta razvila model na individualnem nivoju (angl. Generic Transgene Movement and Persistence – GeneTraMP), ki omogoča natančno spremljanje pojavnosti rastlin v relaciji s pridelovalnimi površinami. Model vključuje obstoječe znanje, ki temelji na bioloških temeljih, ter prenos genov iz transgenih

rastlin v prostoru in času. Begg in sod. (2007) so razvili model za pojavnost obstoječih genskih dogodkov, ki so bili uporabljeni pri vrsti *B. napus*. Ta model je vključeval vplive demografskih in agronomskih dejavnikov na prostorskem nivoju, temeljil pa je na predhodnem modelu, ki so ga razvili Begg in sod. (2006), ter predstavlja pomembno odkritje med dosedanjimi modeli, ki vključujejo poenostavljeno obravnavanje genetskih karakteristik transgenih rastlin in ne vključujejo prostorske heterogenije (Begg in sod., 2006; Colbach in sod., 2001a, b; Pekrun in sod., 2005).

Colbach in sod. (2001a in 2001b) so razvili model GeneSys za ugotavljanje vpliva kmetijske prakse na pretok genov iz gensko spremenjenih posevkov, odpornih na herbicid, na samosevce v naslednjih letih pridelave. Podrobno so opisali prenos peloda na majhnih parcelah in časovno ovrednotili pojavnost samosevnih populacij na polju. Ta model so aplicirali tudi na pogoje pridelave na Danskem v primeru soobstoja gensko spremenjene in gensko nespremenjene pridelave vrste *B. napus* (Østergard in Colbach, 2006). V model so vključili spremenljivke, kot so kolobar, tehnologija gojenja, sortne značilnosti, klimatski podatki, oblika polja, razdalje prenosa cvetnega prahu, ter izračunali število in genotipsko zgradbo v talni semenski banki za posamezno fenofazo razvoja vrste *B. napus* iz genske banke ter napovedali pojavnost samosevnih rastlin v prihodnjih letih za različne sisteme pridelave (ekološko, konvencionalno). Tudi Debeljak in sod. (2011) so v svoji študiji proučevali časovno pojavnost samosevnih rastlin vrste *B. napus* v posevkih glede na različne agrotehnične ukrepe znotraj agroekosistema. Glede na rezultate spremljanja so izdelali sheme, ki vključujejo tudi okoljske dejavnike in prek katerih je mogoče predvideti pojavnost plevelnih (samosevnih) rastlin znotraj pridelovalnih površin.

Podobne študije so na področju modeliranja izvajali na Škotskem, v Nemčiji in v Franciji, vendar po končani obdelavi niso prišli do konkretnih zaključkov in povezav dejavnikov, za katere bi lahko trdili, da zares vplivajo na prisotnost in zagotovljeno pojavnost v naslednjih letih. Zaenkrat še ni povsem jasno, ali so modeli, ki so jih uporabili za prikaz podatkov, neustrezni ali podatki niso pravilni ali pa še vseeno niso zajeli tistih dejavnikov, ki zares vplivajo na kalitev semena vrste *B. napus* iz talne semenske banke. Ugotavljajo namreč, da naj bi prisotnost čisto naključnih sprememb na dani mikrolokaciji vplivala na kalitev v talni semenski banki (npr. zaradi prometne nesreče ob cesti je prišlo do degradacije rastlinskega pokrova in razgolitve tal). Predvidevajo, da se rastline vrste *B. napus* pojavijo predvsem na tistih rastiščih, katerih površina je v času pričetka kalitve gola in na njej ni rastlinskega pokrova, saj naj bi bila vrsta *B. napus* v kalitvenem obdobju zelo slabo kompatibilna z ostalimi semeni v talni semenski banki. Na območjih, na primer ob cesti, kjer je rasla podivjana oblika, je semenila, se je seme oteslo, padlo na tla in ostalo v talni semenski banki, ni za pričakovati, da bo to seme zopet kalilo v prihodnjem letu. Raziskave kažejo, da to seme sicer ostane v talni semenski banki, vendar pa načeloma v prihodnjem letu ne kali zaradi neznanih vzrokov (Debeljak in sod., 2008).

Zaradi potrebe po proučevanju in upravljanju okoljskih procesov poskušajo podatke, ki te procese opisujejo, formalizirati v obliki modelov, s katerimi proučujejo povezave med elementi modela kot tudi njegovo obnašanje.

2.1.7 Področja uporabnosti rastlin vrste *B. napus*

Gomolji podzemne kolerabe (*B. napus* subsp. *napobrassica*) so vsestransko uporabni v prehrani ljudi in živali, zato se v te namene pri nas prideluje tudi podzemna koleraba.

Semena sodobnih oljnih sort vrste *B. napus* v povprečju vsebujejo 40–45 % olja, ki se odvisno od njegove sestave uporablja tako v prehrani kot v industriji. Po končani ekstrakciji olja iz semen nastanejo ostanki (tropine, pogače), ki vsebujejo 38–44 % visokokakovostnih beljakovin. Ti stranski produkti se uporabljajo v prehranskih mešanica pri proizvodnji krmil za živali (Friedt in sod., 2004). Najbolj znana je proizvodnja vrste *B. napus* za biogoriva (metilni ester), uporablja pa se tudi v industriji maziv, hidravličnih olj, mil, detergentov in biorazgradljive plastike (Snowdon in sod., 2007). Po navedbah Lühse in Friedta (1994) se od celotne proizvodnje olja porabi 80 % le-tega v prehrani človeka, 6 % v prehrani živali, 14 % pa kot vhodna surovina v oleokemijski industriji.

Treba je poudariti, da je olje oljnih sort vrste *B. napus* za prehrano ljudi prečiščeno, zato je tudi svetlejša od neprečiščenega surovega olja za industrijske namene. Prav tako je treba razlikovati med oljem oljne ogrščice (*B. napus*) in oljem oljne repice (*B. rapa*). Olje oljne repice v večini ni primerno za prehrano ljudi, njeni stranski produkti pa niti za prehrano živali, saj seme vsebuje prevelike količine antinutritivnih komponent, predvsem glukozinolatov in eruka kisline. Glukozinolati se kot žveplo vsebujoči glukozidi nahajajo v celotni rastlini in predstavljajo njeno trpko-grenko (podobno kot hren) sestavino. Vsebnost žvepla v rastlini kaže tudi rumena obarvanost cvetov, poleg tega pa žveplo deluje antimikrobno, kar je uporabno tudi v smislu ekološkega varstva rastlin pred patogenimi organizmi. Iz tega razloga se olje rastlin, kjer je visoka vsebnost obeh antinutritivnih sestavin zaželena, uporablja v industrijske namene (Piazza in Foglia, 2001).

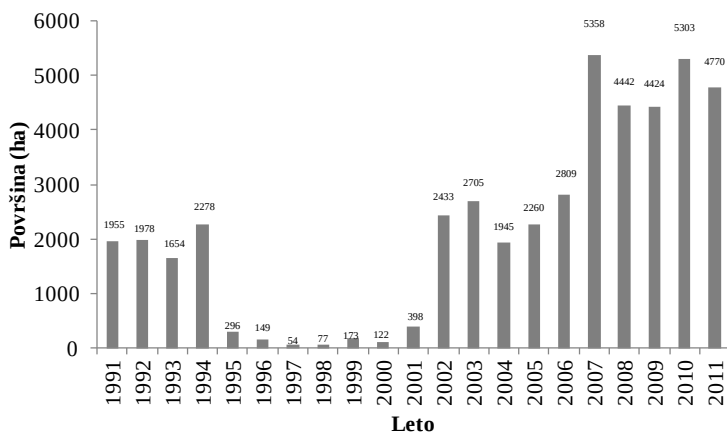
Olje oljne ogrščice kot tudi stranski proizvodi, ki so primerni za prehrano ljudi in krmo živalim, so pridobljeni iz sort, ki so bile požlahtnjene v smeri nizke vsebnosti glukozinolatov in eruka kisline. Ti dve komponenti lahko v večjih količinah na ljudi in živali delujeta toksično (prebavne motnje, nenormalno delovanje notranjih organov itd.) ter zmanjšujeta prehransko vrednost (Snowdon in sod., 2007), zato je tudi njuna najvišja dovoljena vsebnost v semenu zakonsko predpisana. V Uredbi o ureditvi trga s poljščinami (Ur. list RS, št. 22/2004) je namreč določeno, da vsebnost eruka kisline ne sme presegati 2 % od celotne vsebnosti maščobnih kislin, medtem ko vsebnost skupnih glukozinolatov ne sme presegati 25 mikromolov v gramu semena. Genotipi, ki ustrezajo obema zgornjima zahtevama, se imenujejo sorte z dvojno ničlo (angl. double low (00) varieties), ki izvirajo iz sort 'Liho' in 'Bronowski' (Hasan in sod., 2006). Ob tem je pomembno omeniti tudi komercialno ime sort – 'Canola' (angl. CANadian Oil Low Acid), ki so se prvič začele pridelovati v Kanadi leta 1942. Ta izraz označuje tiste sorte, ki prav tako ustrezajo določenim standardom glede nizkih vsebnosti glukozinolatov in eruka kisline v semenu, zato je to olje primerno za prehrano ljudi. Poleg oljne ogrščice se kot sorte 'Canola' lahko uporabljajo tudi ustrezne sorte vrst *B. rapa* in *B. juncea*, vendar v zelo majhnem obsegu (Snowdon in sod., 2007). Najnovejši standardi olja 'Canola' zahtevajo stabilnost pri cvrtju, zato mora biti vsebnost oleinske kisline v olju 70-odstotna in linolenske manj kot 3,5-odstotna (Gororo, 2007). Industrijsko olje se pridobiva iz kultivarjev oljne ogrščice in oljne repice, ki vsebujejo visoke vsebnosti zgoraj omenjenih komponent. Olje iz oljne ogrščice

in oljne repice z visoko vsebnostjo eruka kisline (angl. High Erucic Acid Rape – HEAR) je nepogrešljivo v proizvodnji industrijskih maziv, saj to olje vsebuje kar 50–60 % eruka kisline (Piazza in Foglia, 2001).

Poleg olja so tudi stranski proizvodi pri stiskanju semen nepogrešljivi in ekološko nesporni kot surovine v proizvodnji barv za tiskanje, lepil in različnih polimerov, v medicini in kozmetični industriji ter ne nazadnje tudi kot material za sežiganje. V prehrani ljudi je vedno bolj zaželena uporaba rastlinskih olj v primerjavi z živalskimi maščobami, saj rastlinska olja vsebujejo zelo malo holesterola in imajo ugodnejše razmerje v maščobno-kislinski sestavi. Rastlinsko jedilno olje iz oljne ogrščice je svetlorumene barve in nežnega okusa. Tudi to olje ne sme presegati predpisanih vsebnosti glukozinolatov in eruka kisline. V primerjavi z ostalimi rastlinskimi olji ima olje oljne ogrščice najnižjo vsebnost nasičenih maščobnih kislin (le 6–8 % vseh maščobnih kislin), prav tako ima zelo ugodno razmerje med oleinsko, linolno in linolensko kislino, je bogato z rastlinskimi steroli, ugodno je tudi razmerje med maščobnimi kislinami omega-6 in omega-3 (2 : 1), vsebuje pa tudi zadostne količine vitamina E. Vse te lastnosti uvrščajo olje oljne ogrščice med visokokakovostna rastlinska olja, ki so primerna za pripravo solat, za cvrtje in za kuhanje, poleg tega pa se uporabljajo tudi pri izdelavi margarin, majonez, solatnih prelivov in otroške hrane (Snowdon in sod., 2007).

2.1.8 Razširjenost pridelave v Sloveniji in v svetu

Pridelava oljne ogrščice v Sloveniji v obdobju 1991–2011 je prikazana na sliki 4. Najbolj skoncentrirana je v vzhodni kohezijski regiji, v letu 2011 pa se je pridelovala na približno 1 % vseh pridelovalnih površin v Sloveniji (Pipan in sod., 2011; Rastlinska pridelava ..., 2011).



Slika 4: Pridelava oljne ogrščice v Sloveniji v obdobju 1991–2011 (Rastlinska pridelava ..., 2011)

Figure 4: Oilseed rape production in Slovenia from 1991 to 2011 (Rastlinska pridelava..., 2011)

V Sloveniji so kriteriji za pridelavo semenskih posevkov navadne ogrščice urejeni s Pravilnikom o trženju semena oljnic in predivnic (spremembe pravilnika so bile objavljene leta 2012 v Ur. l. RS, št. 24.). Glede na ta pravilnik mora biti semenski posevek navadne ogrščice za pridelavo osnovnega semena (razen hibridnih sort) oddaljen najmanj 200 metrov od sosednjih virov cvetnega prahu, ki bi lahko povzročili neželjeno tujo oprašitev.

Posevki za pridelavo semena hibridnih sort morajo biti od sosednjih virov cvetnega prahu oddaljeni najmanj 500 metrov. Za pridelavo certificiranega semena, razen hibridnih sort, je predpisana oddaljenost 100 metrov, za pridelavo certificiranega semena hibridnih sort pa 300 metrov.

V svetu je olje oljne ogrščice na tretjem mestu glede na porabo v prehrani, takoj za sojo in oljnimi palmami, glede na porabo oljnih pogač pa je takoj za sojo in bombažem. Največje pridelovalke oljne ogrščice so države Evropske unije (EU-25: 1498 MMT), Kitajska (13,05 MMT), Kanada (8,44 MMT), Indija (6,40 MMT) in Avstralija (1,13 MMT) (Friedt in Snowdon, 2009; Snowdon in sod., 2007).

2.2 SPOLNO KOMPATIBILNI SORODNIKI VRSTE *B. napus*

Visoko sposobnost križanja z vrsto *B. napus* imajo predvsem *B. adpressa* Boiss. (*Hirschfeldia incana* (L.) Lagr.-Foss.), *B. juncea*, *B. nigra*, *B. rapa* (*B. campestris* L.), *B. oleracea*, *Diplotaxis eruroides* (L.) DC., *Diplotaxis muralis* (L.) DC., *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC., *Sinapis alba* L., *Sinapis arvensis* L. (*B. kaber* (D.) LC. Wheeler), *Raphanus raphanistrum* L. *Raphanus sativus* L. in *Rapistrum rugosum* (L.) All. (Stace, 1997). Od 13 naštetih se jih na podlagi pregleda Gradiva za Atlas flore Slovenije (Jogan in sod., 2001) v slovenskem pridelovalnem prostoru v različnih habitatih in oblikah (plevelne, divje ali gojene) pojavlja le 10. To so: *B. rapa*, *B. oleracea*, *B. nigra*, *D. muralis*, *D. tenuifolia*, *R. raphanistrum*, *R. sativus*, *R. rugosum*, *S. alba*, in *S. arvensis*. V doktorski disertaciji smo se zato osredotočili na predstavnike teh vrst in jih v besedilu omenjamo kot spolno kompatibilne sorodnike (SKS), v angleških prevodih preglednic in slik pa kot sexually compatible relatives (SKR) vrste *B. napus*. Poleg tega naštetih SKS-ji cvetijo v času cvetenja vrste *B. napus* (oljne ogrščice) v Sloveniji (Martinčič in sod., 2007). Glede na podatke iz Male flore Slovenije je bila leta 1920 ob železniški progi pri Ljubljani najdena tudi vrsta *D. eruroides* (Martinčič in sod., 2007).

Vrsta *B. rapa* vključuje oljni ogrščici sorodne genotipe sort oljne repice (*B. rapa* L. subsp. *oleifera* DC.), ki so se v preteklosti pridelovale tudi na območju Slovenije in so bile vpisane v slovenske sortne liste. To so bile sorte 'Marino', 'Jugoslavsky' in 'Perko'. Poleg pridelave za olje se *B. rapa* prideluje tudi kot listnata in kot gomoljna zelenjadnica. Oljna repica ima dva srčasta klična lista, tanjše steblo, neodebeljen zgornji del korenine (v primerjavi z oljno ogrščico) in travno zelene liste, pokrite z dlačicami (Kocjan Ačko, 1999). Grozdasto socvetje je sestavljeno iz manjših in za odtenek temnejših rumenih cvetov kot pri oljni ogrščici; pozicija odprtih cvetov v socvetju je pri oljni repici nad (še) zaprtimi cvetovi (popki) (Simard in sod., 2006). Dozorelo seme oljne repice je rdečkastorjavo, ima izrazito mrežasto površino (pod lupo), je svetlejše in bolj drobno od semena oljne ogrščice. Tudi vsebnost olja je nekoliko nižja kot pri oljni ogrščici (Kocjan Ačko, 1999). Za cvetove je značilen SI-mehanizem kontrole oprašitve (Warwick, 2003). *B. rapa* se pojavlja predvsem kot plevelna (ne podivjana) rastlina v različnih habitatih, lahko je enoletna ali dvoletna rastlina, torej hemikriptofit (zelnata trajnica; ob nastopu neugodnega obdobja nadzemni deli odmrejo, zato so brsti na površini tal zaščiteni z odmrlimi deli ali snegom) ali terofit (enoletna zelišča; njihov razvoj traja le eno leto, zato rastline preživijo sušo v obliki semen, ki so zelo odporna) (Martinčič in sod., 2007).

Vrsta *B. oleracea* se pri nas prideluje predvsem kot zelenjadnica, saj različice te vrste vključujejo različne zelenjadnice (cvetačo, brokoli, brstični ohrovt, ohrovt, kitajsko zelje, nadzemno kolerabo). V Sloveniji sta med razširjenimi sortami v pridelavi zelja (*B. oleracea* L. var. *capitata* L.) sorti 'Ditmar' in 'Varaždinsko'. Negojena oblika zelja je znana kot divje zelje, ki je enoletna ali dvoletna rastlina, ki v prvem letu oblikuje rozeto, v drugem pa zacveti (Dixon, 2007). Zgornji listi so sedeči, z zoženim dnom. Starejši cvetovi so nižji od popkov, čašni listi pa so pokončni. Tudi za vrsto *B. oleracea* je značilna SI (Sobotka, 2000). *B. oleracea* se torej pojavlja kot gojena zelenjadnica, neredko pa se zaseje tudi zunaj pridelovalnih površin (Martinčič in sod., 2007).

Rastline iz vrste *B. nigra* (črna ogrščica) imajo pecljate ali pecljato zožene zgornje stebelne liste in luske, prilegle k stebelu. V naravi se redko pojavljajo v gojeni obliki, v glavnem jo najdemo kot podivjano v različnih habitatih. Je terofit, torej enoletna rastlina (Martinčič in sod., 2007).

Vrsta *D. muralis* (obzidni dvoredec) se v Sloveniji pojavlja kot enoletnica ali dvoletnica, torej kot hemikriptofit ali terofit. Nahaja se ob zidovih in na pustih tleh kot divje rastoča rastlina. Lusk je sedeč, z največ 0,5-milimetrskim pecljem. Venec je dolg 4–8 mm, listi pa so razporejeni v razločni pritlični rozeti, kjer se na stebelu nahajajo le 1–3 listi (Martinčič in sod., 2007).

Rastline iz vrste *D. tenuifolia* (tankolistni dvoredec) imajo luske nad mestom namestitve čašnih listov z 1–3-milimetrskim dolgim pecljem. Venec je dolg 8–14 mm. Listi niso v izraziti pritlični rozeti, temveč je steblo olistano po vsej dolžini. *D. tenuifolia* se v Sloveniji pojavlja v podivjani obliki ob zidovih, poteh, nasipališčih in na pustih krajih. Je zelната trajnica, torej hemikriptofit oziroma hamefit (rastline imajo brste do 50 cm nad tlemi, zaščito jim predstavlja sneg ali pa odmrli rastlinski deli) (Martinčič in sod., 2007).

Vrsta *R. raphanistrum* (njivska redkev) se nahaja znotraj pridelovalnih površin kot tudi na ledinah in pustih krajih. Lusk teh rastlin je valjast, členast, ob zrelosti razpade v sodčkaste ali skoraj okrogle enosemenske plodiče. Semena so dolga 2–3 mm. Venec je lahko bele, vijoličasto žilnate ali rumenkaste barve. Je enoletna rastlina, torej terofit. Pri nas naj bi se pojavljala podvrsta subsp. *raphanistrum*, pojavljanje podvrste subsp. *landra* (Moreti ex DC.) Bonnier & Layens pa ni potrjeno (Martinčič in sod., 2007).

Vrsta *R. sativus* (vrtna redkev) je v Sloveniji zastopana v več različicah. Vključuje rastline vrtnih (var. *major* in var. *radicula*) in oljnih redkev (var. *oleiformis*). Na podlagi podatkov iz sortnih list se pri nas pridelujeta sorti 'Acord' in 'Zlata' kot vrtni redkvi ter sorti 'Radical' in 'Toro' kot oljni redkvi. Torej se vrsta *R. sativus* prideluje kot gojena rastlina, pojavlja pa se tudi v podivjani obliki. Je enoletna ali dvoletna rastlina, torej hemikriptofit ali terofit. Lusk je podolgovat, pokončen, nečlenast, ob zrelosti ne razpade. Semena so dolga 3–4 mm, venec pa je vijoličast ali bel z vijoličastimi žilami (Martinčič in sod., 2007).

Rastline iz vrste *R. rugosum* (grbasta repnica) so enoletnice, torej terofiti. Cvetni peclji so krajši ali kvečjemu tako dolgi kot čaša, barva cveta je svetlorumena. Lusk se naglo zoži v 1–4 mm dolg kljunec. Rastline v Sloveniji najdemo na njivah in pustih krajih ter na travnatih pripotjih (Martinčič in sod., 2007).

Vrsta *S. alba* (bela gorjušica) ima pernato deljene in pecljate liste. Luski so večinoma srhkodlakavi, semena pa rumenkasta. V Sloveniji se pojavlja kot gojena rastlina, glede na podatke pa se iz sortnih list pridelujejo sorte 'Achilles', 'Emergo', 'Mirly', 'Serval', 'Siko' in 'Torpedo'. Sicer pa se pojavlja tudi kot podivjana rastlina izven pridelovalnih površin. Je enoletnica in terofit (Martinčič in sod., 2007).

Predstavniki vrste *S. arvensis* (njivska gorjušica) se pri nas pojavljajo kot plevelne rastline v posevkih in kot podivjane rastline, predvsem na nasipališčih in ob transportni infrastrukturi. Imajo cele, neenakomerno in grobo nazobčane liste, spodnji so krpati, zgornji pa sedeči. Luski so goli ali mehkodlakavi, semena pa so črna. *S. arvensis* je enoletna rastlina, torej terofit (Martinčič in sod., 2007).

Kriteriji za pridelavo semenskih posevkov SKS-jev, ki se pojavljajo v slovenskem pridelovalnem prostoru, so urejeni s Pravilnikom o trženju semena oljnic in predivnic (spremembe pravilnika so bila objavljene leta 2012 v Ur. l. RS, št. 24). Pravilnik predpisuje, da minimalna razdalja za pridelavo osnovnega semena znaša 400 metrov oddaljenosti od sosednjih virov cvetnega prahu, ki bi lahko povzročil neželeno tujo oprašitev, in najmanj 200 metrov oddaljenosti za pridelavo certificiranega semena. Ti kriteriji veljajo za SKS-je iz vrst *B. rapa* subsp. *oleifera* (oljna repica) in za *S. alba* (bela gorjušica). Poleg tega so kriteriji zapisani tudi za SKS-je iz vrst *B. nigra* (črna gorjušica) in *B. juncea* (rjava gorjušica). Slednja se pri nas ne prideluje in se ne pojavlja niti kot plevel (Jogan in sod., 2001; Martinčič in sod., 2007; osebna komunikacija z Organom za certificiranje semenske pridelave na Kmetijskem inštitutu Slovenije). Poleg tega se pri nas ne prideluje tudi vrsta *B. nigra* (osebna komunikacija z Organom za certificiranje semenske pridelave na Kmetijskem inštitutu Slovenije).

2.3 POTENCIAL ZA VERTIKALNI PRENOS GENOV

Koncept trajnostnega kmetijstva temelji na zagotavljanju varne in kakovostne hrane, na ohranjanju biotske raznovrstnosti in okolja ter na ekonomski učinkovitosti. Prenos peloda in pretok genov sta ključna dejavnika, ki vplivata na sobivanje različnih kmetijskih praks v nekem območju, še posebej v razdrobljenih območjih z visoko biotsko pestrostjo, kot je Slovenija. V kmetijskih ekosistemih pretok genov poteka s pelodom in semeni. Na navzkrižno opraševanje rastlin med različnimi polji vplivajo predvsem značilnosti rastlinskih vrst (samoprašnice ali tujeprašnice, vetro- ali žužkocvetne) in tudi drugi okoljski dejavniki, kot so vremenske razmere, način kmetovanja in struktura krajine. Zaradi vnosa gensko spremenjenih kmetijskih rastlin veliko raziskav proučuje vpliv pretoka genov s pelodom na okolje, divje sorodnike in naravne populacije. Pretok genov med kmetijskimi rastlinami je poleg nečistosti semena eden od glavnih dejavnikov za nastanek samosevnih in podivjanih populacij, ki prispevajo h konvencionalni in biološki pridelavi. Pojav nenamerno prisotnih gensko spremenjenih rastlin vpliva na soobstoj različnih kmetijskih praks v določeni regiji (npr. pri proizvodnji semena, žlahtnjenju, kolobarjenju). Prenosu peloda lahko posredno sledimo s pomočjo podatkov o genetski sestavi. Križanje med kmetijskimi rastlinami iz različnih polj je odvisno od lastnosti kmetijske rastline in okoljskih dejavnikov, ki vplivajo na pretok genov s pelodom. Študije širjenja peloda pri različnih kmetijskih rastlinah in izdelava modelov so pokazali, da večina

sproščenega peloda pade v bližini vira. Prenos genov s pelodom vpliva na stopnjo izmenjave genetskega materiala v in med populacijami. Pretok genov je lahko želen ali neželen proces, odvisno od konteksta. Pretok genov med plevelom in kmetijskimi rastlinami je neželen zaradi morebitne invazije plevela oziroma nečistosti semenskega materiala (Devos in sod. 2005).

Pri študijah evolucije in genetike so potekale obširne raziskave prenosa peloda in pretoka genov pri cvetočih rastlinah. *B. napus* je ena izmed tistih poljščin, ki ima visok potencial za prenos genov ter za intraspeciesna (znotrajvrstna) križanja s posevki, samosevci in podivjanimi populacijami znotraj rodu *Brassica*, obstaja pa tudi velika verjetnost "vkleščanja genov" (angl. genestacking) kot tudi možnost interspeciesnih (medvrstnih) križanj s SKS-ji iz družine Brassicaceae.

2.3.1 Intraspeciesna križanja vrste *B. napus*

Prenos genov znotraj vrste je mogoč med samosevnimi rastlinami vrste *B. napus* (izvirajo iz izgub semena v preteklih letih znotraj pridelovalnih površin in se v naslednjem letu v posevku pojavljajo kot samosevne oziroma plevelne rastline) (slika 5), s posevki vrste *B. napus* (slika 6) in s podivjanimi populacijami (slika 7), ki so prav tako posledica izgub semena iz preteklih let, vendar se te rastline pojavljajo zunaj pridelovalnih površin, najpogosteje ob celotni prometni infrastrukturi (Pascher in sod., 2006). Zanje je značilno tudi samoohranjanje iz generacije v generacijo prek ohranjenega semena v talni semenski banki.



Slika 5: Samosevci vrste *B. napus* v posevku travno-deteljne mešanice
Figure 5: Volunteers of *B. napus* in grass-clover mixture



Slika 6: Posevek oljne ogrščice
Figure 6: Oilseed rape crop



Slika 7: Podivjane populacije vrste *B. napus* ob cestni infrastrukturi

Figure 7: Feral populations of *B. napus* around road verges

Prenos peloda je možen tudi med posevki različnih podvrst vrste *B. napus*, in sicer med oljno ogrščico (subsp. *napus*) in podzemno kolerabo (subsp. *napobrassica*), torej med oljno in zelenjadno obliko. Zelenjadne oblike vrste *B. napus* se kot pleveli ne pojavljajo na pridelovalnih območjih in se tudi pospravijo v fazi tehnološke zrelosti gomoljev, torej pred cvetenjem. Izjemoma to ne drži, ko gre za semensko pridelavo zelenjadnih sort vrste *B. napus*. Slednja pa zahteva ustrezne izolacijske razdalje in pogoje za pridelovalce semena, ki onemogočajo prenos peloda med sorodnimi vrstami. Prav zato je nastanek hibridov med oljnimi in zelenjadnimi podvrstami praktično nemogoč (Salisbury, 2002).

Verjetnost prenosa genov je funkcija prostorskega obsega. Beckie in sod. (2003) navajajo, da je bila stopnja tujeprašnosti v poljskem poskusu med sosednjimi rastlinami približno 30–50-odstotna. Te ugotovitve združujejo rezultate, pridobljene na podlagi različnih markerjev, ki so jih spremljali v času poskusa (barva cvetnih listov, eruka kislina, izocimi, mutanti z nižjo vsebnostjo klorofila, antibiotična in herbicidna toleranca, emaskulirane oziroma moško sterilne recipientske rastline). Husken in Dietz-Pfeilstetter (2007) ugotavljata, da je največja stopnja tujeprašnosti prisotna znotraj razdalje desetih metrov. Prostorsko gledano pa na stopnjo prenosa genov v naravi (velja tudi za interspeciesna križanja) vplivajo velikost, oblika in orientacija območja vira peloda ter recipientskega območja; med tema dvema območjema pa izolacijska razdalja in fizične bariere – v splošnem dodatno vplivajo še klimatski dejavniki (smer in hitrost vetra, temperatura, vlažnost), lokalna tipografija, prisotnost oprasovalcev, genotip in sinhronizacija cvetenja. Stopnje prenosa genov iz velikih površin posevkov na samosevne/podivjane populacije vrste *B. napus* v bližini so višje kot v obratni smeri (Squire in sod., 1999).

2.3.2 Interspeciesna križanja vrste *B. napus* znotraj družine Brassicaceae

SKS-ji vrste *B. napus* se lahko pojavljajo kot posevki ali pa kot plevelne rastline v kmetijskih sistemih, lahko pa tudi kot divje cvetoče rastline zunaj pridelovalnih površin (Estham in Sweet, 2002) (njihov opis je v točki 2.2). Njihova prisotnost v dejanskih pridelovalnih razmerah lahko omogoči prenos genov iz teh nekultiviranih oblik (plevelnih in podivjanih) v gojene rastline vrste *B. napus*. Uspešen prenos tujih genov je mogoč le, če je cvetenje spolno kompatibilnih rastlin sinhronizirano, če je prostorska razdalja med njimi primerna, če so prisotni oprasovalci ter če sta bili oprasitev in oploditev uspešni (Treu in Emberlin, 2000). Tuja oprasitev je največja na robovih parcel in se po nekaj deset metrih močno zniža, kljub temu pa oprasitev na večje razdalje ni izključena. Tuja oprasitev na večje razdalje je pogostejša v primerih, ko v okolici donorske rastline/posevka ni drugih cvetočih rastlin. Na delež tujeprašnosti zelo pomembno vpliva tudi številčno razmerje (obseg rasti) med donorskimi rastlinami in prejemniki (Squire in sod., 2003). Vprašljivost uspešnosti takih spontanega križanja je v naravi zanimiva zlasti z vidika ustalitve prenesenih genov v populacijo (prenos na potomce). V svoji študiji sta Sheffler in Dale (1994) izpostavila dejavnike, ki vplivajo na spontan prenos genov med vrsto *B. napus* kot posevkom in njenimi SKS-ji. Navajata namreč, da je nemogoče na kratko pojasniti in razložiti tako kompleksno temo. Zapisala sta le najbolj verjetne dejavnike, ki pogojujejo prenos genov med gojeno vrsto *B. napus* in njenimi sorodniki:

- prostorska oddaljenost med rastlinami;

- sinhronizacija cvetenja rastlin;
- postopek širjenja cvetnega prahu;
- posebnosti starševskih genotipov;
- smer prenosa in kompatibilnost cvetnega prahu;
- prisotnost moške sterilnosti pri enem od staršev;
- okoljski dejavniki.

Izpolnjenost in kombinacije zgoraj omenjenih dejavnikov posledično vplivajo na stopnjo prenosa genov med vrsto *B. napus* in njenimi SKS-ji v naravi.

Izmed SKS-jev so predvsem pomembni tisti, katerih cvetni prah je najbolj spolno kompatibilen s cvetnim prahom rastlin vrste *B. napus*. Potencial prenosa genov med vrsto *B. napus* in njenimi SKS-ji je predstavljen v preglednici 1. Najvišjo stopnjo križanja z vrsto *B. napus* ima vrsta *B. rapa*, takoj za njo pa vrste *R. raphanistrum*, *H. incana* in *S. arvensis* (Scheffler in Dale 1994; Stace, 1997; Salisbury, 2002; Salisbury, 2006).

Preglednica 1: SKS-ji vrste *B. napus* (Scheffler in Dale 1994; Stace, 1997; Salisbury, 2002)

Stopnja spolne kompatibilnosti (1 – najvišja spolna kompatibilnost, 2 – srednja spolna kompatibilnost, 3 – nizka spolna kompatibilnost), možnost nastanka hibridov prek umetne oprašitve (ročnega križanja) z vrsto *B. napus*, možnost nastanka hibridov v naravi prek spontane oprašitve in introgresija genov iz genoma vrste *B. napus* v genome SKS-jev.

Table 1: SKR of *B. napus* (Scheffler and Dale 1994; Stace, 1997; Salisbury, 2002)

Level of sexual compatibility (1-the highest sexual compatibility, 2-the medium sexual compatibility, 3-low sexual compatibility), possibility of hybrids with *B. napus* by hand, possibility of hybrids with *B. napus* by spontaneous pollination in nature and gene introgression from *B. napus* genome into genomes of SKR.

Ime rastline	Genus, species	Stopnja spolne kompatibilnosti z vrsto <i>B. napus</i>	Nastanek hibridov prek umetne oprašitve	Nastanek hibridov v naravi	Introgresija genov
Repa/oljna repica	<i>B. rapa</i>	1	da	da	da
Rjava gorjušica	<i>B. juncea</i>	1	da	da	da
Zelje/kapus/broskva	<i>B. oleracea</i>	3	da	ni podatka	ni podatka
Črna gorjušica	<i>B. nigra</i>	3	da	da	ni podatka
Siva gorjušica	<i>B. adpressa/H. incana</i>	2	da	da	ni podatka
Njivska redkev	<i>R. raphanistrum</i>	2	da	da	ni podatka
Rukvičasti dvoredec	<i>D. eruroides</i>	3	da	ni podatka	ni podatka
Obzidni dvoredec	<i>D. muralis</i>	3	da	ni podatka	ni podatka
Bela gorjušica	<i>S. alba</i>	3	da	ni podatka	ni podatka
Njivska gorjušica	<i>S. arvensis</i>	2	da	da	ni podatka
Tankolistni dvoredec	<i>D. tenuifolia</i>	3	da	ni podatka	ni podatka
Grbasta repnica	<i>R. rugosum</i>	3	da	ni podatka	ni podatka
Vrtna redkev	<i>R. sativus</i>	3	da	ni podatka	ni podatka

Vsi zgoraj navedeni divji sorodniki večinoma spadajo tudi med plevelne rastline, ki se pojavljajo znotraj pridelovalnih površin. Iz tega razloga jih je lažje nadzorovati, problem pa nastane zaradi izjemno kratkih razdalj med temi rastlinami, kar je povezano z večjo verjetnostjo prenosa genov. Poleg tega so te rastline mnogo bolj dolgožive, sploh na slabše obdelanih lokacijah in na polnaravnih habitatih, saj jih agrotehnični in kemični ukrepi redko zajamejo (Treu in Emberlin, 2000). Možnosti križanj med vrsto *B. napus* in

posameznimi SKS-ji, ki se pojavljajo v slovenskem pridelovalnem prostoru (predstavitev v točki 2.2), so opisani v nadaljevanju.

2.3.2.1 *B. rapa*

B. rapa je 2n-vrsta in ima podobno zgodovino pojavljanja kot *B. napus*, le da ima vrsta *B. rapa* krajšo rastno sezono, ter se prav tako prideluje kot ozimna in jara oblika (Colton in Potter, 1999). Obe vrsti si delita tudi skupno garnituro kromosomov, zato je spontano križanje v naravi med tema dvema vrstama najbolj verjetno (Jørgensen, 1999). Potomci spontanega križanja (v obe smeri) so sposobni tudi za življenje (Metz in sod., 1997). Frekvenca spontanega nastalih hibridov v naravi je odvisna od starševskih genotipov, zasnove poskusa oziroma topografskih značilnosti in velikosti populacije (Jørgensen, 1999).

Meritve prenosa genov med vrstama *B. napus* kot posevkom in rastlinami *B. rapa* v obliki podivjanih populacij izven pridelovalnih površin v naravi so pokazale 0,4–1,5-odstotno frekvenco križanja in manj kot 2-odstotno stopnjo preživetja nastalih križancev (Scot in Wilkinson, 1998). V danski študiji so na podlagi poljskih poskusov ugotovili, da je bil delež semena križancev 93-odstoten, pri čemer je bila vrsta *B. rapa* edina znotraj posevka vrste *B. napus*. Razmerje nastalega hibridnega semena je bilo tam, kjer je bila vrsta *B. rapa* ženski starš, 13-odstotno, tam, kjer je bila vrsta *B. napus* ženski starš, pa 9-odstotno. Obe vrsti sta bili posejani v enakem razmerju (1 : 1) (Jørgensen, 1996). Te ugotovitve so potrdile tudi raziskave v Kanadi (Warwick in sod., 2003). Vrsta *B. rapa* je obligatno tujeprašna (zaradi SSI), zato se posledično večji delež oprasitev zgodi, ko ta nastopa kot ženski starš (Jørgensen, 1996).

Hauser in sod. (1998) so ugotovili, da so spontano nastali F1-križanci med plevelnimi rastlinami vrst *B. rapa* in plevelnimi/podivjanimi *B. napus* srednje vitalni v primerjavi s starševskima vrstama, predvsem pa značilno bolj vitalni od starša vrste *B. rapa*. Vzrok je po navedbah Halfhilla in sod. (2005) v različni stopnji plevelnosti starševskih rastlin iz vrste *B. rapa*. V naslednji generaciji so bili F2-križanci precej manj vitalni, kar omogoča znižano sposobnost prenosa genov z vrsto *B. napus* (Sutherland in sod., 2006).

Prenos genov v naravi med vrsto *B. napus* in zelenjadnimi oblikami vrste *B. rapa* (strniščna repa) tudi v primeru njene semenske pridelave praktično ni mogoč, če se pridelovalci semenskih posevkov za vrsto *B. napus* držijo predpisov o izolacijskih razdaljah. Poleg tega se tudi zelenjadne oblike vrste *B. rapa* v pridelovalnem prostoru ne pojavljajo kot plevelne ali podivjane rastline (Salisbury, 2002).

2.3.2.2 *B. oleracea*

Podatki o nastalih križancih med zelenjadnimi oblikami vrste *B. oleracea* in vrsto *B. napus* so objavljeni le na podlagi umetnih križanj, medtem ko pa o križancih, ki nastanejo prek spontanega oprasitve v naravi, ne poročajo. Poleg tega se vse zelenjadne oblike vrste *B. oleracea* poberejo v času tehnološke zrelosti plodov, zato do križanj ne more priti (Salisbury, 2002; Salisbury, 2006).

Četudi imata vrsti *B. oleracea* in *B. napus* skupen set kromosomov v genomu, je introgresija genov med vrstama teoretično mogoča, saj je frekvenca uspešno nastalih križancev že prek umetnih oprašitev redka, predvsem tam, kjer se vrsta *B. oleracea* pojavlja kot ženski starš (Estham in Sweet, 2002). Narava pridelave obeh vrst v Sloveniji je v splošnem v naravi zaradi nesinhronizacije cvetenja in fizične razdalje med rastlinami med tema dvema vrstama praktično nemogoča.

2.3.2.3 *R. raphanistrum*

R. raphanistrum spada v skupino SKS-jev, ki imajo srednjo verjetnost oprašitve z vrsto *B. napus* (Scheffler in Dale 1994; Stace, 1997; Salisbury, 2002; Salisbury, 2006). Reiger in sod. (2001) so ugotovili, da je stopnja prenosa genov med vrstama *B. napus* in *R. raphanistrum* predvsem odvisna od smeri opraševanja. Predvidevajo namreč, da so križanja na relaciji, kjer je *B. napus* oprašena z *R. raphanistrum*, bolj verjetna kot križanja v nasprotni smeri. Poleg tega so ugotovili tudi, da je kljub temu stopnja križanja že v prvi relaciji zelo nizka, in sicer dve rastlinici, ki sta nastali s križanjem, od skupno $5,2 \times 10^7$ rastlinic vrste *B. napus*. Warwick in sod. (2003) navajajo, da imajo F1-križanci manj kot 1 % za življenje sposobnega peloda in so skoraj sterilni, vendar se fertilnost lahko izboljša z njihovim povratnim križanjem z *R. raphanistrum*. Chevre in sod. (2003) so pregledali genomsko strukturo F1-križancev med gensko spremenjeno *B. napus* (AACC, $2n = 38$) in *R. raphanistrum* (RrRr, $2n = 18$), pri čemer so pričakovali genomsko strukturo ACRr, $2n = 28$. Izmed 23 transgenih križancev jih je bilo 18 s pričakovano genomsko strukturo ACRr ($2n = 28$), štirje križanci z genomsko strukturo AACCRrRr ($2n = 56$) in eden z nereducirano gameto genoma *R. raphanistrum* ($2n = 37$, ACRrRr). Morfološko so bili vsi križanci identični gensko spremenjeni *B. napus*, razen tistega, ki je imel genomsko strukturo $2n = 37$, ACRrRr, ki je bil dejansko vmesen med obema starševskima vrstama.

2.3.2.4 *H. incana*

H. incana spada v skupino SKS-jev, ki imajo srednjo verjetnost oprašitve z vrsto *B. napus* (Scheffler in Dale 1994; Stace, 1997; Salisbury, 2002; Salisbury, 2006). Darmency in Fleury (2000) predvidevata, da je vrsta *H. incana* variabilna, kar se tiče SSI-lastnosti, in da križanje med takimi rastlinami da večje število luskov in semen na rastlino. Poleg tega je možno doseči tudi višjo stopnjo oprašitve med vrsto *B. napus* in *H. incana* na polju (Halfhill in sod., 2004). Fertilnost, ustreznost semen in sposobnost za življenje F1-križancev med tema dvema vrstama so zelo nizke. Antere rastlin križancev skoraj ne proizvajajo cvetnega prahu, rastline imajo namreč le nekaj cvetov in nekaj luskov, ki proizvedejo skupno 2×10^3 manj semen kot rastline vrste *H. incana*. Za primer so Lefol in sod., (1996) izmed skupno 168 semen, ki so nastali s križanjem, vzgojili le pet rastlinic. Trije od teh F1-križancev so bili sterilni, ostali dve rastlini pa sta po povratnih križanjih z vrsto *H. incana* skupno proizvedli 62 semen.

Dolgoživost F1-semena, ki nastane s križanjem vrst *B. napus* in *H. incana* v naravi, ima 15-odstotni potencial v prvem letu in celostno izčrpanje v 41 mesecih (Chadoeuf in sod., 1998).

2.3.2.5 *S. arvensis*

S. arvensis je uvrščena v skupino SKS-jev, ki imajo srednjo verjetnost oprašitve z vrsto *B. napus* (Scheffler in Dale 1994; Stace, 1997; Salisbury, 2002; Salisbury, 2006). Večina študij, ki so bile objavljene na temo spolne kompatibilnosti vrst *B. napus* in *S. arvensis*, so vključevale umeten prenos peloda prek ročne oprašitve oziroma uporabo tehnike reševanja embria. Ti dve tehniki sta se izkazali kot edini učinkoviti. Prek recipročnih križanj so bile frekvence v 1,2-odstotnem deležu, kjer se je vrsta *B. napus* uporabila kot ženski starš, in v 0,1-odstotnem deležu, kjer se je vrsta *S. arvensis* uporabila kot ženski starš (Lefol in sod., 1996). Warwick in sod. (2003) so v svoji raziskavi prenosa genov v naravi zbrali 79 podivjanih populacij vrste *S. arvensis*, ki so se pojavljale na območju, kjer se je 1–2 leti pred tem pridelovala gensko spremenjena *B. napus*. Izmed vseh 43.000 mladih rastlinic niti ena ni vsebovala transgenov, kar kaže, da je stopnja oprašitve med vrstama *B. napus* in *S. arvensis* manjša od 2×10^{-5} .

2.3.2.6 *B. nigra*

V poljskih poskusih sočasnega gojenja vrst *B. napus* in *B. nigra* niso identificirali nobenih pravih križancev (Bing in sod., 1996). Tudi drugi avtorji (Kerlan in sod., 1992; Brown in Brown, 1996) poročajo o neuspešnih poskusih križanja med tema dvema vrstama, celo prek umetnih oprašitev. Bing in sod. (1996) so ugotovili, da je zato prenos genov v primeru pridelave transgenih sort vrste *B. napus* dejansko nemogoč. Poročajo pa o možnostih križanja med vrstama *B. juncea* (AABB-genom) in *B. nigra* (BB-genom), saj si delita skupni set kromosomov (Salisbury, 2006).

2.3.2.7 *R. sativus*

Ammitzboll in Jørgensen (2006) navajata, da je bila oprašitev med vrstama *R. sativus* in moško sterilno *B. napus* pod kontroliranimi pogoji v rastlinjaku, kjer so bili prisotni opraševalci (čebele), uspešna, vendar z nizko fertilnostjo peloda. Sicer pa ni podatkov o oprašitvi teh dveh vrst v naravi.

2.3.2.8 *D. muralis*, *D. tenuifolia* in *R. rugosum*

Kot je predstavljeno v preglednici 1, ni nobenih podatkov in raziskav, ki bi dokazovale nastanek križancev prek spontanih oprašitev v naravi med vrsto *B. napus* in SKS-ji iz vrst *D. muralis*, *D. tenuifolia* in *R. rugosum*.

2.4 POTENCIAL ZA HORIZONTALNI PRENOS GENOV ZNOTRAJ DRUŽINE BRASSICACEAE IN MED PROKARIONTI

Pomembna tema v evoluciji vrste *B. napus* je horizontalni prenos genov (angl. Horizontal Gene Transfer – HGT) med nekaterimi predstavniki križnic (*A. thaliana*, *B. napus*) in prokariotskimi organizmi. Omejili se bomo na gene iz družine ciklofilinov (angl. cyclophilins), izoliranih iz *A. thaliana*, za katere pa je znano, da so nekatere identične oblike peptidov omenjenih genov našli tudi v vrsti *B. napus*. Poleg tega pa rezultati, ki jih prikazuje filogenetsko drevo (Chou in Gasser, 1997), kažejo na možnost HGT-ja iz družine

ciklofilinov med prokarionti in evkarionti ter na možen polifilogenetski izvor teh proteinov znotraj evkariontov.

HGT je tako kot lateralni prenos genov (angl. Lateral Gene Transfer – LGT) vsak proces, pri katerem organizem prenese genetski material v neko drugo celico brez oprašitve. To je v nasprotju z vertikalnim prenosom, kjer organizem sprejme genetski material od svojega prednika, na primer od starša oziroma od organizma, iz katerega je razvil. V genetiki so se v preteklosti usmerjali predvsem na pomen takrat »prevladujočega« vertikalnega prenosa, v zadnjem času pa raziskave tečejo tudi v smeri HGT-ja kot pomembnega fenomena (Chou in Gasser, 1997).

HGT je bil prvič opisan na Japonskem leta 1959, in sicer v publikaciji, ki je opisala prenos antibiotične odpornosti med različnimi vrstami bakterij (Ochiai in sod., 1959), vendar pa pomembnost teh raziskav na Zahodu ni bila upoštevana še nadaljnjih deset let. Biolog Syvanen je leta 1984 objavil vrsto študij, ki so opisovale HGT ob predvidevanju, da obstaja lateralni prenos genov, ki je biološko pomemben in predstavlja proces, ki oblikuje evolucijsko zgodovino že od vsega začetka življenja na Zemlji. Umeten HGT pa je oblika in orodje genetskega inženiringa. Lake in sod. (2004) navajajo, da se pomembne študije genov in genomov izvajajo predvsem na HGT-ju med prokarionti, ta fenomen pa nakazuje tudi na pomembnost za enocelične evkarionte (kraljestvo protista), kar potrjujejo tudi Baptiste in sod. (2005), saj naj bi bil HGT pomemben mehanizem v evoluciji organizmov iz kraljestva protista (protozoa, fikomicete, miksomicete, kvasovke). Razširjenost in vloga HGT-ja v evoluciji mnogoceličnih evkariontov (kraljestva gliv, rastlin in živali) pa še vedno ostajata zelo nejasni (Richardson in sod., 2007).

HGT se lahko torej na nivoju rastlinskih evkariontov izvaja med posameznimi rastlinskimi vrstami, lahko pa poteka tudi po liniji med prokarionti in rastlinskimi evkarionti, odvisno od evolucijskega izvora genov. Relacija neciljanega prenosa genov (v smislu, da ta poteka spontano in ne v okviru biotehniških metod) v naravnih habitatih med prokarionti in evkarionti je v večini primerov še zelo neraziskana.

Na podlagi splošno nizke stopnje evolucije sekvenc v rastlinskih mitohondrijskih genih je pomembno predvsem dejstvo, da je prenos mitohondrijske DNA, ki je bila prenesena znotraj iste družine, pogosto težko zaznati kot HGT, saj so razhodi genskih sekvenc očitno premalo specifični. Ta omejitev pa lahko predstavlja svojevrstno bariero za doseg celostnega pogleda na časovni model medrastlinskega HGT-ja, predvsem če katera dominantna oblika prenosa vsebuje mehanizme (nepravilna oprašitev), ki delujejo v prid tesno povezanim donorjem in recipientom (Richardson in Plamer, 2006).

Jasno je, da rastlinski mitohondrij izmenjuje gene dokaj pogosto, zato je potrebna interpretacija rastlinske filogeneze enega ali več mitohondrijskih genov, kar pa včasih prav tako ne odraža pomembne filogenije organizma. Na srečo filogenetske analize pri rastlinah v glavnem temeljijo na kloroplastnih sekvencah, ki so imune na HGT. Tudi v tistih raziskavah, kjer so bili vključeni mitohondrijski geni, so poskus izdelali tudi konjunktivno s kloroplastnimi ali jedrnimi geni (Richardson in Plamer, 2006). Četudi je HGT v rastlinskem mitohondriju v nasprotju z radikalnim pridobivanjem novih fenotipov (kot je pogosto pri bakterijah), so evolucijske posledice teh novih genov še dokaj neznane.

Rastlinski jedrni genomi tipično vsebujejo na ducate nazadnje prenesenih delov dednine (ali tudi celotne genome) endogene ali mitohondrijske DNA (Richardson in Plamer, 2006). Zadnja odkritja tovrstnih transpozicijskih HGT-procesov so bila dokazana na travah (Diao in sod., 2006; Ghatnekar in sod., 2006).

HGT ima v razvoju organizmov pomembno funkcijo ter se dogaja tako znotraj prokariontov in znotraj evkariontov kot tudi med prokarionti in evkarionti. Filogenetske analize sorodnosti s prisotnostjo ciklofilinov v organizmih na podlagi homologov in poravnave aminokislinskih zaporedij kažejo različne stopnje povezanosti organizmov med sabo. Filogenetska drevesa dokazujejo, da so CyP-genji prisotni tako pri prokariontskih organizmih kot tudi pri višjih rastlinah, povsod pa imajo podobno funkcijo. Objave na temo horizontalnega prenosa CyP-genov med prokarionti in evkarionti zagovarjajo različna stališča. Vsa se zdijo verjetna, a zaenkrat zanesljiva potrditev prave ugotovitve še ni objavljena, čeprav raziskave na to temo potekajo že od leta 1984. Mnenja se razhajajo predvsem na nivoju izvora CyP-genov, saj nekateri menijo, da naj bi se ti genji iz prokariontskih organizmov v evkariontske vključili z endosimbiontskim procesom kloroplastov in mitohondrijev (Blanchard in Lynch, 2000). Drugi navajajo možnost, da se je divergenca najverjetneje zgodila v skupnem predniku evbakterij in evkariontov, zaradi česar ima določen spekter evkariontskih ciklofilinov polifiletski izvor (Trandinh in sod., 1992). Obstaja pa tudi enostavna razlaga podobnosti ciklofilinov, po kateri naj bi prišlo do spontanega horizontalnega prenosa CyP-genov iz evkariontov v prokarionte, saj naj bi ciklofilini izvirali iz evkariontskih organizmov (Chou in Gasser, 1997).

2.5 KARAKTERIZACIJA GENETSKE RAZNOLIKOSTI NA MOLEKULARNEM NIVOJU

Za opis organizmov na različnih nivojih se uporabljajo genski markerji, s pomočjo katerih poskušamo najti raznolikost med posameznimi rastlinami, sortami, populacijami ipd. Znotraj genskih markerjev se za razlikovanje med posameznimi organizmi uporabljajo morfološki, biokemijski in molekularski markerji. Z uporabo morfoloških markerjev se poskušajo najti razlike na ravni ekspresije genov in okolja, z biokemijskimi markerji se ugotavljajo predvsem znaki na ravni ekspresije genov (in vpliva okolja), za ugotavljanje znakov na nivoju DNA, pri čemer vpliv okolja ni zajet, pa se uporabljajo molekularski markerji (Štajner, 2010). Uporaba genskih markerjev je pripomogla k boljšemu poznavanju genetske sestave populacij in k določevanju vpliva evolucijskih procesov, ki so botrovali oblikovanju genetske zgradbe rastlinskih genotipov. Genski markerji so nepogrešljivi pri karakterizaciji predvsem zaradi visoke stopnje polimorfizma (karakterizacija genske variabilnosti), možnosti ločevanja med homozigoti in heterozigoti (kodominantnost), odsotnosti pleiotropizma, velike pogostnosti in enakomerne razporeditve v genomu. Genetske analize z uporabo genskih markerjev ne zajemajo vplivov okolja, njihovo določevanje je visoko ponovljivo in primerljivo med laboratoriji (Štajner, 2010).

Molekularski markerji določajo znake na nivoju DNA (DNA-markerji) in so zato neodvisni od okolja. Marker (označevalec) predstavlja zaporedje (fragment) na DNA, ki ga je mogoče identificirati in spremljati njegovo dedovanje. Z različnimi metodami molekularskih markerjev lahko vrednotimo DNA-polimorfizme in jih uporabljamo za kartiranje genomov, DNA-fingerprinting, filogenetske analize in nasploh za upravljanje z genskimi

viri (tudi za pridobivanje informacij o nekodogenih sekvencah). Molekulske markerje uporabljamo za označevanje lokacije gena, saj so locirani na specifičnih mestih (lokusih) v genomu, in tako lahko spremljamo dedovanje izbrane lastnosti. So visoko informativni (zaradi visoke stopnje polimorfnosti) in uporabni za vse organizme (Štajner, 2010). Glede na različne karakteristike posameznih molekulskih markerjev in glede na njihov namen uporabe ločimo več vrst molekulskih markerjev, katerih uporaba je opisana v točki 2.5.1.

2.5.1 Uporaba molekulskih markerjev v genetskih analizah znotraj družine Brassicaceae

Molekulski markerji so na široko uporabni pri mapiranju agronomsko pomembnih genov pri vrstah *Brassica*, in to predvsem pri žlahtnjenju ter selekciji. Tudi celotno sekvenciranje genoma modelne križnice, *A. thaliana*, ki predstavlja tudi bližnjega sorodnika vrste *B. napus*, je odprlo možnosti primerjalnih analiz kompleksne strukture genoma rodu *Brassica* in podalo pomemben vpogled v njihovo zgradbo ter v evolucijski razvoj (Quiros in sod., 2001; Schmidt in sod., 2001). Aplikacije visoko informativnih molekulskih markerjev, ki so bili uporabljeni v genomskih analizah *A. thaliana*, imajo tako pomemben vpliv tudi na genetske analize in žlahtnjenje poljščin iz rodu *Brassica*. Po navedbah Schmidta (2002) je homolognost med eksoni domnevno ortolognih genov pri *Arabidopsis* in *Brassica* 80–90-odstotna, kar pomeni, da je genetsko znanje pri *Arabidopsis* zelo uporabno za identifikacijo in karakterizacijo genov tudi pri rastlinah iz rodu *Brassica*. Trenutni glavni izzivi na področju genetike in žlahtnjenja pri rodu *Brassica* so predvsem uskladiti nove z že obstoječo standardizirano nomenklaturro ter odkriti in povezati lokuse (gene) v genomu vrste *B. napus* z relevantnimi fenološkimi, morfološkimi in agronomskimi lastnostmi, in sicer v smeri povezovanja teh informacij tudi na obsežnejšem nivoju z drugimi sorodnimi genskimi viri. Tak pristop bi lahko pripomogel k odkrivanju in razumevanju pomembnih mejnikov v genetiki znotraj rodu *Brassica* na bolj globalnem nivoju (Snowdon in Friedt, 2004). Vzporedno z odkritjem PCR-tehnike in razvojem molekulskih markerjev so se pri vrsti *B. napus* razvijali tudi markerski sistemi za odkrivanje agronomsko pomembnih lastnosti, ki so sedaj nepogrešljiv del žlahtnjenja navadne ogršče. Ker pa se te lastnosti lahko dedujejo tudi poligeno (na eno lastnost vpliva večje število genov), je bil potreben začetek razvoja markerjev za detekcijo dedovanja kvantitativnih lastnosti (angl. Quantitative Trait Locus – QTL), ki vplivajo tudi na fenotip rastline. Vendar pa v primeru kvantitativnih lastnosti markerji niso vedno prenosljivi v drug genetski material, saj so tudi fizične razdalje med markerji zelo velike, zato pogosto za izvedbo klasičnega QTL-mapiranja tudi razvoj učinkovitih markerjev za odgovarjajoče gene ne zadostuje. To pa je eden izmed glavnih razlogov, zakaj do danes z uporabo markerskih sistemov (na nivoju DNA) še ni bila uspešno izvedena selekcija za kvantitativne lastnosti (Snowdon in Friedt, 2004).

Biokemijski markerji (proteinski, izoencimski) so še vedno zelo uporabni na področju komercialnega žlahtnjenja rastlin, sicer pa so se raziskave v genomu z uporabo markerskih sistemov rodu *Brassica* začele že okrog leta 1980 z razvojem RFLP-tehnike (polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov; angl. Restriction Fragment Length Polymorphism) na področju povezovalnih genetskih map med *B. oleracea*, *B. rapa* in *B. napus* (Snowdon in Friedt, 2004). Z odkritjem in razvojem PCR-tehnike (leta 1987) ter s tem omogočenim naraščanjem specifičnosti molekulskih markerjev v obstoječih genetskih mapah zaradi

možnosti namnožitve visoko polimorfni fragmentov v PCR-analizi je bil prvi med odkritimi RAPD-markerji (naključno namnožena polimorfna DNA; angl. Randomly Amplified Polymorphic DNA), ki sta mu sledila še AFLP (polimorfizem dolžin namnoženih fragmentov; angl. Amplified Fragment Length Polymorphism) in ISSR (angl. Inter-Simple Sequence Repeats). Možnost identifikacije anonimnih PCR-fragmentov, ki se navezujejo na proučevane lastnosti, je omogočilo odkritje SCAR- (angl. Sequence Characterized Amplified Region) in STS- markerjev (angl. Sequence Tagged Site), kar je pomenilo osnovo za razvoj enostavnih markerjev, primernih in uporabnih v komercialnem žlahtnjenju navadne ogrščice. Nadaljnji napredek na tem področju se je začel z odkritjem SSR-jev (angl. Short Sequence Repeats), mikrosatelitov, ki spadajo med najbolj uporabne molekulske markerje, predvsem na področju spremljanja nenadzorovanih križanj in ugotavljanja stopnje prenosa genov pri vrsti *B. napus* in njenih sorodnikih. Zaradi svoje visoke polimorfnosti, robustnosti in relativno enostavne izvedbe analiz so mikrosateliti zelo učinkoviti in informativni.

Leta 2001 sta Li in Quiros razvila novo tehniko molekulskih markerjev, SRAP (angl. Sequence-Related Amplified Polymorphism), za namen namnoževanja sekvenc znotraj ORFs (angl. Open Reading Frames), znotraj katerega se nahaja zaporedje baz, ki kodira protein – mRNA. Uporaba teh markerjev je bila najprej uspešno izvedena pri *B. oleracea*, njihova namnožitev pa je poleg ostalih poljščin uspešna in uporabna tudi pri *B. rapa* in *B. napus*.

Leta 1998 so Bagger Jørgensen in sod. objavili študijo o možnostih prenosa genov iz gensko spremenjene vrste *B. napus* na sorodni plevelni vrsti *B. rapa* in *B. juncea* v poljskih poskusih (za oceno tveganj). Genetske analize križanj so opravili z uporabo RAPD-markerjev, pri čemer so poskušali karakterizirati prenos genskega materiala iz medvrstnih hibridov v prvo generacijo križancev (BC₁) v križanjih *B. napus* z *B. rapa*. Uporabili so 33 specifičnih markerjev za *B. napus*, vsi povratni križanci pa so vsebovali za vrsto *B. napus* specifične markerje (uspešen prenos vseh analiziranih DNA-markerjev). V Nemčiji so v letih 2004–2007 spremljali prenos transgenov iz gensko spremenjene vrste *B. napus* na divje sorodnike. Analizirali so izvor, pojavnost in gensko variabilnost podivjanih populacij vrste *B. napus* v SZ Nemčiji. Ugotavljali so vpliv virov pridelave na pojavnost podivjanih populacij, saj je bilo kar 72 % analiziranih lokacij zadnji dve leti posejanih z oljno ogrščico. Z uporabo mikrosatelitov (analiza z le štirimi pari začetnih oligonukleotidov) so ugotovili, da je bila po pričakovanjih genetska raznolikost znotraj podivjanih populacij višja kot med posejanimi kultivarji (referenčne sorte, ki so se pridelovale na tem območju), kar pomeni, da je prišlo do križanj med posevki in podivjanimi rastlinami, ki so se samoobnavljale in razširjale iz leta v leto. Rezultati te študije kažejo na evlucijski potencial podivjanih rastlin vrste *B. napus*, kar pomeni tudi posledice pri nadzoru soobstoja gensko spremenjenih z gensko nespremenjenimi posevki na določenem območju pridelave. Prisotnost podivjanih rastlin tako služi kot akumulativni vir za intra- in interspeciesna križanja ter omogoča pojavnost transgenih rastlin zunaj pridelovalnih površin (Elling in sod., 2009). Z namenom detekcije prenosa genov iz kultivirane na sorodne divje plevelne vrste, konkretno na divjo redkev (*R. raphanistrum*), so razvili posebna DNA-zaporedja znotraj lokusov, specifičnih za vrsto *B. napus*. To so SINE-zaporedja (angl. Short Interspersed Element), ki v kombinaciji s SSAP-metodo (angl. Sequence-Specific Amplified Polymorphism) tvorijo kompleks, katerega prisotnost so določili v divji redkvi

z namenom preverjanja prenosa genov iz vrste *B. napus*. Ta markerski kompleks naj bi služil kot uporabno orodje za sledljivost in frekvenco vgrajenih regij genoma vrste *B. napus* v genom divje redkve (Prieto in sod., 2005).

Glede na dejstvo, da so vrste znotraj rodu *Brassica* izjemno nagnjene k morfološki genotipski variabilnosti, ki je v genome vnesena s pomočjo umetne selekcije za različne tipe poljščin, so tudi pri požlahtnjeni vrsti *B. napus* poskušali ugotoviti gensko variabilnost s pomočjo genskih map z uporabo RFLP-jev v primerjavi z izvornimi genomi svojih staršev (*B. rapa* in *B. oleracea*). S pomočjo primernih RFLP-jev in ustreznih starševskih genotipov so odkrili odločilne alele, ki združujejo ali ločujejo vse tri genome, kar je bila osnova za izdelavo integriranih in primerjalnih genetskih map ter za določevanje agronomsko pomembnih lastnosti pri selekciji vrste *B. napus* (Parkin in sod., 1995).

Uporaba mikrosatelitov je za določevanje sorodnosti in prenosa genov v veliki večini objav v zadnjih letih najbolj zastopana v primerjavi z ostalimi molekulskimi markerji (RAPD, AFLP, RFLP), ki so se uporabljali pred mikrosateliti. Trenutno najbolj sveža in pomembna med molekulskimi markerji je zagotovo kombinacija uporabe namnoževanja SNP (angl. Single Nucleotide Polymorphisms)/INDEL-zaporedij v fragmentih *B. napus* za podrobno ugotavljanje sorodnosti in dopolnitve izdelave demonstrativnih genskih map s pomočjo že obstoječih podatkov o zaporedjih v genomu. Westermeier in sod. (2009) so razvili SNP/INDEL-markerje na osnovi 181 fragmentov iz 121 različnih genskih sekvenc ob uporabi različnih selekcijskih metod (genomsko specifična namnoževanja, analiza heterodupleksov, sekvenčna analiza), kar je omogočilo detekcijo 18 enojnih fragmentov, ki so med sabo razlikovali 6 različnih sort vrste *B. napus*, na skupno 87 SNP-jih in 6 INDEL-ih. Največ SNP-jev in INDEL-ov so našli na nekodirajočih regijah. Rezultati te analize zagotovo predstavljajo uporabo že obstoječih genomskih virov za nadaljnji razvoj novih SNP-jev pri vrsti *B. napus*.

2.5.2 Uporaba mikrosatelitnih markerjev za analizo genetske raznolikosti vrste *B. napus* in njenih spolno kompatibilnih sorodnikov

Pomembna lastnost mikrosatelitov, ki jih loči od večine molekulskih markerjev, je ta, da se v PCR-reakciji namnožujejo predhodno znane sekvence (lokusi) DNA, ki so določene z nukleotidnim zaporedjem paraspecifičnih začetnih oligonukleotidov. Sicer pa so mikrosateliti 2–6 baznih parov (bp) dolga ponovljiva nukleotidna zaporedja, sestavljena iz določenega motiva, ki so v genomu naključno razporejeni. Mikrosateliti se dedujejo v skladu z Mendelovim zakonom (dve kopiji alela od obeh staršev, ki sta lahko različno dolga). Odlikuje jih visoka pogostnost pojavljanja in enakomerna razporejenost v genomih evkariontov, so kodominatni, hipervariabilni, visoko polimorfni in zato tudi zelo informativni. V genetskih študijah predstavljajo idealen markerski sistem, slaba stran pa je predvsem dokaj zahtevna identifikacija novih mikrosatelitov. Velika variabilnost mikrosatelitov je povezana tudi z dejstvom, da je v genomu evkariontov naključno razporejenih 10^4 – 10^5 mikrosatelitnih lokusov, kar pomeni veliko število polimorfnih mest, ki jih lahko uporabimo za genetske markerje. Mutacijska stopnja mikrosatelitov se na posamezno generacijo giblje od 10^{-5} do 10^{-2} (Weber in Wong, 1993) in je veliko višja kot stopnja baznih substitucij. Prevladuje mnenje, da mikrosateliti večinoma niso podvrženi selekciji, in prav zato proces mutacije igra toliko večjo vlogo pri določanju dolžine in

razporeditve mikrosatelitov (Schlötterer, 2000). V obrobni regiji mikrosatelitskih lokusov pogosto nastajajo mutacije (Orti in sod., 1997), posledica česar je lahko nastanek ničtih alelov. Lažna smrt mikrosatelita se lahko pojavi kadar koli in je posledica nukleotidnih substitucij, insercij ter delecij, ki nastanejo v obrobni regiji, zaradi česar začetni oligonukleotidi ne prepoznajo mest prileganja. Rezultat takšnega procesa so ničti aleli (Callan in sod., 1993), ki se lahko ustalijo v populaciji (Štajner, 2010).

Z uporabo mikrosatelitov so Bond in sod. (2004) ugotavljali izvor dolgo obstoječih podivjanih populacij (njihovo ohranjanje izvira iz talne semenske banke) vrste *B. napus* na nekem pridelovalnem območju. Z uporabo mikrosatelitov so DNA podivjane navadne ogrščice primerjali z DNA zimskih sort (13) vrste *B. napus*, ki so se pridelovale na raziskovanem območju. Ugotovili so, da je bilo kar nekaj rastlin genetsko zelo podobnih zimskim sortam, medtem ko pa so za neprimerljive vzorce z zimskimi sortami predvidevali, da izvirajo iz izgub semena ob transportu ali kakršnih koli drugih aktivnosti, ki so povezane s premeščanjem semena. Podobno študijo (Avstrija) so leta 2006 objavili tudi Pascher in sod., ki so poskušali ugotoviti izvor podivjanih populacij na različnih rastiščih (globoka tla, neobdelana površina, ob cesti, ob železniški progi, ob reki, ob gozdu, ob neki kmetiji). DNA teh rastlin so prav tako primerjali z referenčnimi sortami vrste *B. napus*, ki so se v obdobju štirih let pridelovale v območju proučevanih lokacij. Z uporabo petih parov začetnih oligonukleotidov, ki so specifični za *B. napus*, so ugotavljali tudi gensko variabilnost znotraj podivjanih populacij rastlin istega rastišča. Rezultati genetskih analiz so pokazali, da so kar tri od devetih populacij zelo sorodne z nekaterimi referenčnimi sortami, predvsem na območjih, kjer je bilo površin pod oljno ogrščico veliko. Poleg tega pa je pri tem pomembna tudi genetska struktura referenčnih sort, saj hibridi predstavljajo bolj invazivne donorje. Zelo nizko stopnjo vnosa genov iz referenčnih sort v analizirane podivjane populacije so ugotovili le za populaciji na dveh različnih rastiščih. Ugotovili so tudi, da je stopnja vnosa genov iz referenčnih sort (se pridelujejo kot posevki) v podivjane rastline kar petkrat višja kot v obratni smeri. Te izsledke so s pridom uporabili tudi pri aplikacijah v primeru soobstoja s transgenimi posevki oljne ogrščice in posledic za druge sisteme kmetijske pridelave ter s tem za akumulacijo transgenov v naravi na daljše časovno obdobje in gensko spremenjeno kontaminacijo ostalih sorodnikov. Gensko diverziteto znotraj družine Brassicaceae so ugotavljali tudi z uporabo mikrosatelitov. Plieske in Struss (2001) sta v svoji študiji pregledala genome z 81 lokusno specifičnimi začetnimi pari oligonukleotidov, ki izvirajo iz vrste *B. napus*. Kar 83 % se jih je uspešno namnožilo v genomih *B. oleracea* in *B. rapa* (oba starša), manj kot 30 % pri *B. nigra* in 30–35 % pri manj sorodnih *D. ssp.*, *S. alba*, *R. sativus*, *Eruca sativa*. Pri *A. thaliana* se je uspešno namnožilo le 19,8 % lokusov. Ugotovila sta veliko genetsko raznolikost med jarimi in zimskimi sortami ter tudi znotraj sort navadne ogrščice.

Zadnje študije genetske raznolikosti znotraj vrste *B. napus* in z njenimi SKS-ji znotraj družine Brassicaceae so bile opravljene na podlagi alelnih dolžin izbranih mikrosatelitnih markerjev na 2n-nivoju, torej na podlagi 2n-kodominatnih vhodnih matrik (Pascher in sod., 2006; Pascher in sod., 2010). Prikaz rezultatov in njihova interpretacija je bila zato zelo obširna in povezujoča, poleg tega so bili rezultati prikazani tudi v obliki stopenj prenosa genov med vsemi pojavnimi oblikami vrste *B. napus* v naravi in tudi med referenčnimi sortami na določenih pridelovalnih območjih. V nasprotju pa nekatere objave iz zadnjih let, ki prav tako vključujejo analizo genetske raznolikosti, predvsem znotraj vrste, in

identifikacije podivjanih populacij vrste *B. napus* v naravi, podajajo rezultate na podlagi binarnih vhodnih matrik, pridobljenih na podlagi PCR-profilov z uporabo istih mikrosatelitnih markerjev. Njihove interpretacije so bolj skope, saj statistične obdelave podatkov z razpoložljivimi genetskimi programi tega ne omogočajo. Prav tako ne podajajo rezultatov o stopnji prenosa genov, tujeprašnostih in populacijskih statistikah (Bond in sod., 2004; Elling in sod., 2009; Hasan in sod., 2006). Hasan in sod. (2008) so na podlagi binarnih podatkov objavili članek o genetski identifikaciji vsebnosti glukozinolatov znotraj sort vrste *B. napus* z uporabo mikrosatelitnih markerjev.

Poleg uporabe mikrosatelitov na jedrni DNA smo med objavami zasledili tudi genetske analize, v katerih so proučevali abiotske (veter) in biotske (čebele, čmrlji) dejavnike, ki vplivajo na prenos genov med gensko spremenjenimi in gensko nespremenjenimi posevki vrste *B. napus*, s pomočjo plastidnih mikrosatelitov. Za boljše razumevanje in izdelavo ocene tveganja v primeru sobivanja z gensko spremenjeno vrsto *B. napus* so uporabili plastidne SSR-je, ki predstavljajo novo metodo za določanje inter- in intraspeciesne genetske variabilnosti znotraj družine Brassicaceae. S kombinacijo rezultatov jedrnih in plastidnih mikrosatelitov, ki omogočajo natančno ugotavljanje stopnje prenosa peloda in semena med različnimi posevki, so tudi v tej študiji predvideli stopnjo oprašitve na določenih razdaljah med gensko spremenjenimi in gensko nespremenjenimi posevki (Flannery in sod., 2004).

Strmenje k poznavanju genoma tako vsestransko uporabne in industrijske pomembne rastline, kot je vrsta *B. napus*, ki se lahko prideluje praktično v celem zmerno klimatskem pasu, je vsekakor utemeljeno – tako v preteklosti in sedanjosti kot tudi v prihodnosti.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 ANALIZA GENETSKE RAZNOLIKOSTI

3.1.1 Prostorska identifikacija lokacij in terensko vzorčenje

Predhodni pregled pojavljanja SKS-jev iz družine Brassicaceae, ki so se sposobni oprašiti z vsemi pojavnimi oblikami vrste *B. napus*, je potekal na podlagi pregleda objav. Od 13 predstavljenih se jih na podlagi pregleda Građiva za Atlas flore Slovenije (Jogan in sod., 2001) v slovenskem pridelovalnem prostoru v različnih habitatih in oblikah (divje ali gojene) pojavlja le 10 (glej točko 2.2).

Prisotnost pojavnih oblik vrste *B. napus* in njenih SKS-jev v različnih habitatih smo predvideli znotraj statističnih regij, kjer se vrsta *B. napus* največ prideluje, to je ob transportni infrastrukturi in na lokacijah, kjer lahko prihaja do nenadzorovanega raztrosa. Iz tega razloga smo predvidene lokacije vzorčenja najbolj zgostili v regijah, kjer se je po podatkih Pipana in sod. (2011) v zadnjih petih letih vrsta *B. napus* pridelovala v največjem obsegu. To je v pomurski, podravski, spodnjeposavski in savinjski regiji. Manjši obseg lokacij vzorčenja smo zajeli v regiji jugovzhodna Slovenija ter v osrednjeslovenski in gorenjski regiji. Najmanjši obseg vzorčenja smo predvideli v zasavski, notranjsko-kraški, obalno-kraški in goriški regiji, kjer je pridelava praktično minimalna. Identifikacija predvidenih lokacij vzorčenja znotraj regij je bila usmerjena predvsem na:

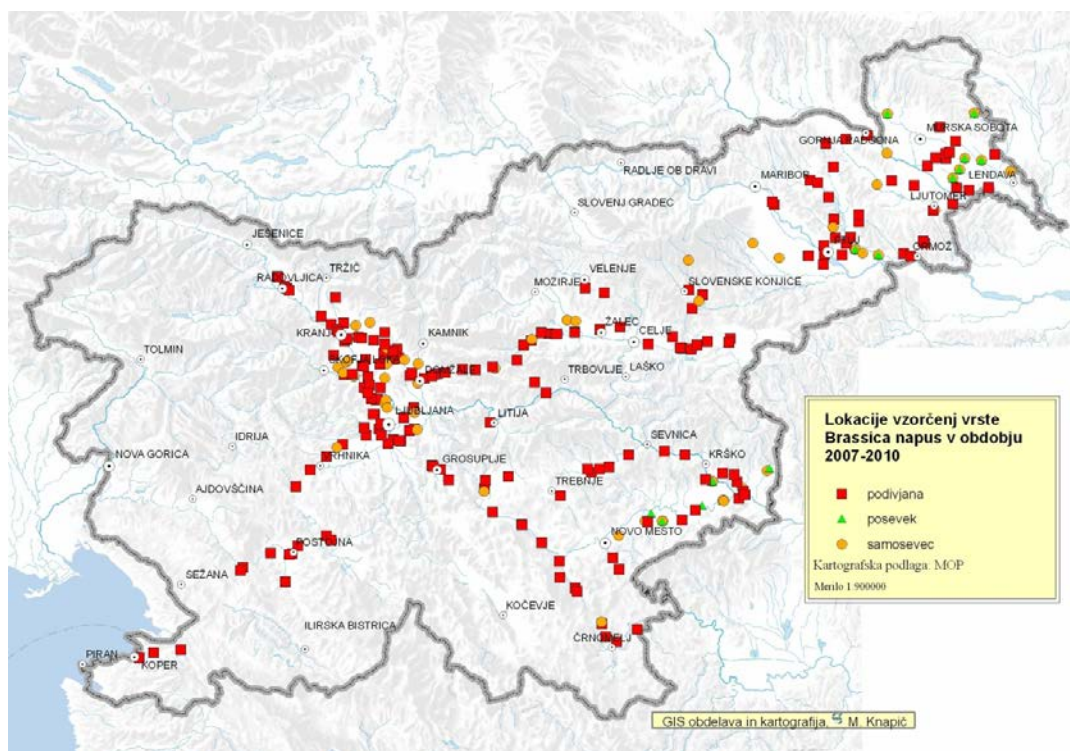
- obrobja cestne infrastrukture (lokalne in regionalne ceste);
- krožna križišča;
- nasipe;
- obcestna počivališča;
- jarke;
- obrobja železniških prog;
- območja degradiranih talnih površin, predvsem na okolico novogradenj;
- neobdelana območja;
- poljske poti;
- robove njiv;
- obmeške;
- območja znotraj pridelovalnih površin, kjer so se nahajale samosevne/plevelne oblike.

Vzorčenja na območju avtocestnega omrežja zaradi varnosti nismo predvideli. Dodatno pa smo predvideli lokacije, kjer se je v času organizirane pridelave oljne ogrščice zbiral pridelek vseh vključenih pridelovalcev (Brežice, Gančani), in tudi obmorsko pristanišče (območje Luke Koper).

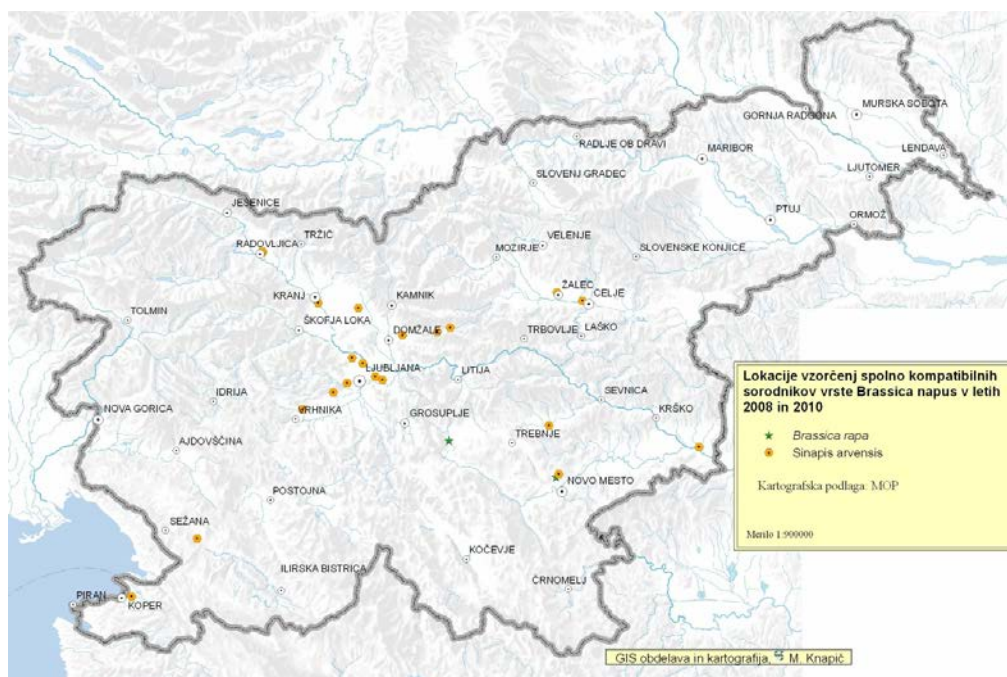
Vsa predvidena mesta vzorčenja so po pogostnosti pojavljanja različno razporejena glede na obseg pridelave v posamezni regiji in glede na dejansko nahajanje vzorca na predvidenih mestih, saj smo želeli lokacije vzorčenja identificirati čim bolj reprezentativno. Poleg predvidenih lokacij vzorčenja, na podlagi katerih smo se v naravi orientirali in jih poskušali zajeti, smo vzorčili tudi na naključnih lokacijah, kjer so se dejansko rastline nahajale, četudi jih predhodno nismo predvideli. Kriterij, ki smo ga

upoštevali pri vseh lokacijah, ki so vključene v analizo, je bil, da se na površini 5 m² nahaja najmanj pet rastlin iste vrste. To je veljalo tako za posevke kot tudi za samosevne in podivjane populacije vrste *B. napus* ter za njene SKS-je v vseh štirih letih vzorčenja.

Poleg prostorske dimenzije smo v doktorsko disertacijo vključili tudi časovno komponento, saj je vzorčenje na območju celotne Slovenije potekalo v zaporednih letih 2007, 2008, 2009 in 2010. Vzorčili smo v času cvetenja oljne ogrščice, to je od zadnjega tedna v aprilu do konca drugega tedna v maju, saj so takrat rastline najbolj opazne. Sočasno smo v analizo vključili tudi SKS-je, in sicer tiste, ki cvetijo v istem obdobju in so lahko vključeni v opraševalne relacije z vrsto *B. napus*. Izkazalo se je, da sta v slovenskem pridelovalnem prostoru to *B. rapa* in *S. arvensis*, ki sta se pojavljali v obliki plevelnih in podivjanih rastlin (slika 9) le v letih 2008 in 2010. Rastline vrste *B. napus* smo vzorčili v obliki posevkov (v letu 2007), kot samosevne rastline znotraj pridelovalnih površin in kot podivjane populacije zunaj pridelovalnih površin (slika 8). Po celotni Sloveniji smo v vsaki sezoni terenskega vzorčenja (vsako leto) prevozili 1200–1800 kilometrov.



Slika 8: Pregled lokacij vzorčenja glede na pojavno obliko vrste *B. napus* v obdobju 2007–2010
Figure 8: Screening of sampling locations according to the appearance forms of *B. napus* in 2007–2010



Slika 9: Pregled lokacij vzorčenja glede na pojavnost SKS-jev v času cvetenja oljne ogrščice v letih 2008 in 2010

Figure 9: Screening of sampling locations according to the appearance of the SKR (sexually compatible relatives) in the flowering time of *B. napus* in 2008 and 2010

Za namen natančnega opisa lokacij vzorčenja na terenu smo predhodno izdelali tudi posebne formularje, v katere smo vpisovali vsa opažanja in podatke z mesta, kjer smo rastlinski vzorec nabrali. Formularji so bili izdelani tako za vzorčenje rastlin vrste *B. napus* kot tudi za njene SKS-je in so vključevali naslednje rubrike:

- lokacija (ime kraja) in oznaka nabranega rastlinskega vzorca;
- datum vzorčenja;
- rastišče, kjer se vzorčene rastline nahajajo (ob cesti, obmejek, nasip itd.), in pojavna oblika vzorčenih rastlin (posevek, samosevna, podivjana);
- število rastlin na lokaciji vzorčenja, ki je zajemala površino v velikosti 5 m²;
- okvirni opis okolice lokacije vzorčenja;
- geografska pozicija lokacije vzorčenja (WGS84-koordinatni sistem);
- oznaka fotografije lokacije (če obstaja);
- prisotnost posevka oljne ogrščice v bližnji okolici in približna razdalja do njega;
- prisotnost SKS-ja v bližnji okolici in približna razdalja do njega (velja za vzorčenje rastlin vrste *B. napus*);
- prisotnost drugih pojavnih oblik (samosevne, podivjane) vrste *B. napus* v bližnji okolici in približna razdalja do njih;
- ime SKS-ja (velja za vzorčenje spolno kompatibilnih sorodnikov);
- opombe in posebnosti.

Do (bližine) lokacij vzorčenja smo se peljali z avtom. Od vsake od petih rastlin na isti lokaciji vzorčenja smo vzeli po en zdrav mlad list, nato pa smo vse skupaj shranili v označeno najlonsko vrečko, ki smo jo označili z nalepko z imenom lokacije vzorčenja – za vsako lokacijo smo iz varnostnih razlogov pripravili dva vzorca. Pri vzorcih, nabranih v

letih 2007 in 2008, smo za lokacije, kjer so se nahajale podivjane in samosevne populacije, pripravili štiri vzorce, ker smo druga dva shranili za analizo prisotnosti gensko spremenjenih organizmov, ki je opisana v točki 3.3.6. Vzorce, nabrane istega dne, smo skozi čas vzorčenja in med transportom do Kmetijskega inštituta Slovenije shranjevali v hladilni torbi z akumulatorskim priklopom in hlajenjem v avtu. Za nadaljnje analize smo rastlinski material shranili v laboratoriju na -20°C . Pri botaničnem določanju SKS-jev na terenu smo si pomagali z določevalnim ključem – Mala flora Slovenije (Martinčič in sod., 2007). Za geografsko pozicijo lokacij vzorčenja smo uporabljali satelitsko navigacijo Garmin nūvi 700, prek katere smo natančno odčitali koordinate, zapisane s koti (lon/λ [E] in lat/φ [N]). Na mestu vzorčenja smo za vsako lokacijo posebej izpolnili formular po zgoraj naštetih rubrikah. Za grafični prikaz lokacij vzorčenja in obdelavo rezultatov na nivoju genetske in geografske povezanosti zbranih vzorcev smo potrebovali geografske podatke v obliki Gauss-Krügerjevega koordinatnega sistema (koordinate X [m] in Y [m]). To je transversalni Marcatorjev koordinatni sistem, položen prek Besselovega lokalnega elipsoida, njegovi parametri pa so bili določeni tako, da se kar najbolj prilega področju nekdanje Jugoslavije. Geografske koordinate WGS84-koordinatnega sistema (referenčni elipsoid, določen leta 1984 tako, da se najbolj prilega Zemlji v celoti), ki nam jih je podala satelitska navigacija Garmin, smo zato pretvorili iz kotov v metre s pomočjo spletnega pretvornika GEOCONV (Pretvornik ..., 2012), da so bili podatki o geografski poziciji uporabni za nadaljnjo obdelavo in prikaz.

3.1.2 Pridobivanje in vzgoja referenčnega materiala

Za namene genetske primerjave in identifikacije izvora samosevnih in podivjanih populacij vrste *B. napus* ter prenosa genov z njenimi SPK-ji smo pridobili tudi rastlinski material (seme) tako imenovanih referenčnih sort, ki smo jih skupaj z vzorci s terena vključili v genetsko analizo. Z izrazom genotip ali genski vir v predstavljenem delu označujemo sorte, akcesije in kultivarje. Referenčni genotipi vrste *B. napus* so vključevali sorte vrste *B. napus* (oljne in krmne ogrščice ter podzemne kolerabe), ki so se na območju Slovenije pridelovale od leta 1984 do leta 2010. Referenčni genotipi SKS-jev pa so zajemali vrste, ki so se pojavljale v slovenskem pridelovalnem prostoru kot posevki ali kot plevelne in podivjane rastline v istem časovnem obdobju. Informacije o imenih referenčnih sort smo pridobili prek pregleda različnih nacionalnih evidenc (sortne liste, prodajni katalogi semenarskih hiš, sezname sort v preizkušanjih) in ostalih internih evidenc, shranjenih na Kmetijskem inštitutu Slovenije. Objavljeni so tudi podatki o sortni sestavi vrste *B. napus* v obdobju 1984–2010 (Pipan in sod., 2011). Referenčnih sort in vrst, ki so bile vključene v analizo genetske raznolikosti, je bilo skupno 80, od tega 58 sort vrste *B. napus* (preglednica 2) in 22 predstavnikov SKS-jev (preglednica 3). Njihovo seme smo pridobili iz različnih virov (preglednici 2 in 3):

- genskih bank na IPK-ju (angl. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben) in RICP-ju (angl. Research Institute of Crop Production Prague-Ruzyne) prek baze EURISCO;
- semenarskih podjetij, ki tržijo seme (K – KWS SAAT AG Einbeck, SL – Semenarna Ljubljana, S – Syngenta Agro);
- internih genskih virov semenskega laboratorija na Kmetijskem inštitutu Slovenije (KIS), kjer se zbira in hrani seme posevkov za posebno preizkušanje v obliki standardnih in malih standardnih vzorcev.

Semena petih sort vrste *B. napus* ('Asgard', 'Danica', 'Petrol' in 'Zora'), ki so se v preteklosti prav tako pridelovale v Sloveniji, pa nismo uspeli pridobiti niti pri njihovih vzdrževalcih.

Preglednica 2: Referenčne sorte vrste *B. napus*, vključene v analizo genetske raznolikosti (Liste ..., 2006, 2012)

¹ V – zelenjadna oblika, W – ozimna oblika, S – jara oblika, OSR – oljna ogrščica, F – krmna ogrščica (Pipan in sod., 2011; Hasan in sod., 2006) in H – hibrid ali I – inbridirana linija.

Table 2: Reference varieties of *B. napus* included in genetic differentiation analysis (Liste..., 2006, 2012)

¹ V-vegetable form, W-winter form, S-spring form, OSR-oilseed rape, F-fodder rape (Pipan et. al., 2011; Hasan et. al., 2006) and H-hybrid or I- inbred line.

Št.	Latinsko ime referenčnega genotipa	Ime referenčne sorte navadne ogrščice ali podzemne kolerabe	Ime/oznaka referenčnega genotipa	Oblika/tip uprabe ¹	Donator (akcesija)
1.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'Adder'	WOSR	KIS
2.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Krmna ogrščica	'Akela'	WF	KIS
3.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'Alaska'	WOSR	KIS
4.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'Allure'	WOSR	KIS
5.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Krmna ogrščica	'Arista'	SF	K
6.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'Baldur'	WOSR, H	KIS
7.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'Baros'	WOSR	KIS
8.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'Bienvenu'	SOSR	IPK (CR 181)
9.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'Brilland (t)' ('Gorczański')	WOSR, I	RICP (15O0100016)
10.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'Bristol'	WOSR	KIS
11.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Krmna ogrščica	'Daniela'	F	KIS
12.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'Darmor'	WOSR	RICP (15O0100228)
13.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Krmna ogrščica	'Digger'	WOSR	KIS
14.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'Express'	WOSR	KIS
15.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'GK Gabriella'	WOSR	KIS
16.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'GK Helena'	WOSR	KIS
17.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Krmna ogrščica	'Helga'	SF	KIS
18.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napobrassica</i>	Rumena koleraba	'Hofmanova rumena'	V	KIS
19.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'Honk'	WOSR	KIS
20.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'Jet Neuf'	WOSR	RICP (15O0100120)
21.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'Kronos'	WOSR, H	KIS

Se nadaljuje.

Nadaljevanje.

Št.	Latinsko ime referenčnega genotipa	Ime referenčne sorte navadne ogrščice ali podzemne kolerabe	Ime/oznaka referenčnega genotipa	Oblika/tip uprabe ¹	Donator (akcesija)
22.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Krmna ogrščica	'Milena'	WOSR	KIS
23.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'Mohican'	WOSR	KIS
24.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'Molino'	WF	KIS
25.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'Navajo'	WOSR	SL
26.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'NK Nemax'	WOSR	S
27.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'NS-L-36'	WOSR	KIS
28.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'NS-L-39'	WOSR	KIS
29.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'Ontario'	WOSR	KIS
30.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Krmna ogrščica	'Petranova'	SF	RICP (15O0200161)
31.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'PR44W29'	W, H	KIS
32.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'PR45D01'	WOSR	KIS
33.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'PR45D03'	WOSR	KIS
34.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'PR45D05'	WOSR, H	KIS
35.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'PR45W04'	OSR	KIS
36.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'PR46W14'	WOSR, H	KIS
37.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'PR46W15'	WOSR, H	KIS
38.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'PR46W24'	WOSR, H	KIS
39.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'PR46W31'	WOSR, H	KIS
40.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'Rasmus'	WOSR	KIS
41.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'Remy'	W	KIS
42.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'Robust'	WOSR	KIS
43.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'Rodeo'	WOSR	K
44.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'Rohan'	WOSR, H	KIS
45.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napobrassica</i>	Rumena koleraba	'Rumena maslena'	V	KIS
46.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'Smart'	WOSR	KIS

Se nadaljuje.

Nadaljevanje.

Št.	Latinsko ime referenčnega genotipa	Ime referenčne sorte navadne ogrščice ali podzemne kolerabe	Ime/oznaka referenčnega genotipa	Oblika/tip uprabe ¹	Donator (akcesija)
47.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Krmna ogrščica	'Starška'	WF	KIS
48.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'Tandem'	WOSR	RICP (15O0100171)
49.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'Tassilo'	WOSR, H	K
50.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'Titan'	WOSR, H	KIS
51.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'Triangle'	WOSR, H	KIS
52.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'Viking'	WOSR	KIS
53.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'Visby'	WOSR, H	KIS
54.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Krmna ogrščica	'Viva'	WF	IPK (CR 1043)
55.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'X08W982 I.'	WOSR, H	KIS
56.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'X08W984 I.'	WOSR, H	KIS
57.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'Xenon'	WOSR, H	KIS
58.	<i>B. napus</i> subsp. <i>napus</i>	Oljna ogrščica	'Zenith'	WOSR	KIS

Preglednica 3: Referenčni genotipi SPK-jev, vključeni v analizo genetske raznolikosti

² C – kultivar, W – divji, 4n – tetraploid (Liste ..., 2006, 2012).

Table 3: Reference genotypes of SKR included in genetic differentiation analysis

² C-cultivar, W-wild, 4n-tetraploid (Liste..., 2006, 2012).

Št.	Latinsko ime referenčnega genotipa	Slovensko ime referenčnega genotipa	Ime/oznaka referenčnega genotipa	Status ²	Donator (akcesija)
1.	<i>B. nigra</i>	Črna gorjušica		W	RICP (15O0600021)
2.	<i>B. nigra</i>	Črna gorjušica		W	RICP (15O0600018)
3.	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Zelje	'Ditmar'	C	SL
4.	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Zelje	'Varaždinsko'	C	SL
5.	<i>B. rapa</i> subsp. <i>oleifera</i>	Oljna repica	'Marino'	C	RICP (15O0300012)
6.	<i>B. rapa</i> subsp. <i>oleifera</i>	Ojlina repica	'Jugoslavsky'	C	RICP (15O0300007)
7.	<i>B. rapa</i> subsp. <i>oleifera</i>	Oljna repica	'Perko'	C, 4n	IPK (CR 2885)
8.	<i>D. muralis</i>	Obzidni dvoredec		W	IPK (DIPLO 5)
9.	<i>D. tenuifolia</i>	Tankolistni dvoredec (divja rukola)		W	SL
10.	<i>R. raphanistrum</i> subsp. <i>landra</i>	Njivska redkev		W	IPK (RA 728)
11.	<i>R. sativus</i> var. <i>major</i>	Vrtna redkev	'Acord'	C	RICP (09H7300066)
12.	<i>R. sativus</i> var. <i>radicula</i>	Vrtna redkev	'Zlata'	C	RICP (09H7400138)
13.	<i>R. sativus</i> var. <i>oleiformis</i>	Oljna redkev	'Radical'	C	KIS
14.	<i>R. sativus</i> var. <i>oleiformis</i>	Oljna redkev	'Toro'	C	KIS
15.	<i>Rapistrum rugosum</i> subsp. <i>linneanum</i>	Grbasta repnica		W	IPK (RAP 1)
16.	<i>S. alba</i>	Bela gorjušica	'Achilles'	C	SL
17.	<i>S. alba</i>	Bela gorjušica	'Emergo'	C	IPK (CR 1806)
18.	<i>S. alba</i>	Bela gorjušica	'Mirly'	C	IPK (CR 2818)
19.	<i>S. alba</i>	Bela gorjušica	'Serval'	C	IPK (CR 1825)
20.	<i>S. alba</i>	Bela gorjušica	'Siko'	C	IPK (CR 1817)
21.	<i>S. alba</i>	Bela gorjušica	'Torpedo'	C	SL
22.	<i>S. arvensis</i>	Njivska gorjušica		W	IPK (CR 2591)

Po 40 semen vsakega referenčnega genskega vira vrste *B. napus* in 15 semen SKS-jev smo jeseni leta 2009 posejali v pladnje, napolnjene s šoto, v rastlinjaku. Rastline smo vzgajali pod kontroliranimi pogoji do četrtega pravega lista. V tej fazi smo od vsake od petih rastlin istega genskega vira vzeli po en zdrav list in jih združili v označeni (ime, oznaka in ponovitev – a, b, c) najlonski vrečki. Vsak referenčni genski vir vrste *B. napus* smo vzorčili v treh ponovitvah (za analizo genetske raznolikosti znotraj genotipa), vsakič iz drugih rastlin (skupno iz 15 rastlin istega genskega vira), medtem ko smo referenčne genske vire SKS-jev vzorčili enkrat (skupno iz petih rastlin istega genskega vira). Vzorce listov referenčnega materiala smo do izolacije DNA shranili na –20 °C.

3.1.3 Priprava vzorcev rastlinskega materiala za izolacijo DNA

Priprava vzorcev je potekala enako za ves rastlinski material, vključen v analizo genetske raznolikosti, saj smo bili že ob nabiranju vzorcev na terenu in ob vzorčenju v rastlinjaku pozorni, da je potekala predpriprava vzorcev za izolacijo DNA na način, da ne bi bilo treba istega materiala večkrat odmrzovati.

Pri vsakem od petih listov posameznega vzorca smo vzeli približno enak košček rastlinskega tkiva (približno 0,5 cm² površine lista) in jih združili v 2-mililitrsko mikrocentrifugirko. Skupno smo tako pridobili približno 100–120 mg rastlinskega materiala posameznega vzorca, ki smo ga uporabili v izolaciji DNA.

3.1.4 Izolacija celokupne DNA

Izolacija DNA iz rastlinskega listnega tkiva je potekala na robotu za izolacijo nukleinskih kislin, imenovanem KingFisher mL (Thermo), z uporabo BioSprint 15 DNA Plant Kita (Qiagen), in to po optimiziranem protokolu, saj je bilo treba volumne reagentov v protokolu prilagoditi rastlinskemu materialu v analizi. Postopek temelji na uporabi tehnologije magnetnih delcev (angl. MagAttract technology), kjer se DNA-molekule, predhodno izlužene iz celic organskih tkiv, vežejo na kremenasto površino magnetnih delcev (magnetna suspenzija) v prisotnosti kaotropične soli. Tako vezana DNA se v posameznih fazah učinkovito spere v alkohol vsebujoče pufre in etanol, čemur sledi hitro sušenje na zraku, kar izboljša čistost DNA. V zadnji fazi končno DNA dobimo raztopljeno v pufru ali vodi.

V pripravljene mikrocentrifugirke z rastlinskim materialom posameznega vzorca (točka 3.3.1) smo vstavili dve jekleni kroglici in dodali 300 RLT lizacijskega pufra. Nato smo za razkrojitev in homogenizacijo vzorca mikrocentrifugirke položili v adapter za mikrocentrifugirke ter ga vstavili v razkrojevalec tkiv – TissueLyser (Retsch) za štiri minute na maksimalno frekvenco (30 s⁻¹). Inkubacije nismo izvajali, saj se je izkazalo, da je splošna kakovost izolirane DNA brez inkubacije za PCR (angl. Polymerase Chain Reaction) boljša od inkubiranih vzorcev, saj po naših predvidevanjih ta poleg višjega izplena DNA vzporedno omogoča tudi ekstrakcijo raznih inhibitorjev, ki motijo aktivnosti v PCR-postopku. Po končani homogenizaciji smo vzorce enajst minut centrifugirali na temperaturi 21 °C pri relativni centrifugalni sili 12.000 g. Vmes smo si na kovinsko stojalo robota pripravili plastične tablične nastavke s petimi mikrocentrifugirkami, za vsak vzorec enega, kamor smo odpipetirali reagent za vsako stopnjo ekstrakcije posebej. Zaporedje reagentov v mikrocentrifugirkah enega nastavka za posamezni vzorec je bilo naslednje:

- 1. mikrocentrifugirka nastavka: po končanem centrifugiranju smo previdno odpipetirali 210 µl supernatanta, mu dodali 200 µl 2-propanola in 20 µl magnetne suspenzije, ki smo jo predhodno tri minute stresali na MaxiMix II (Thermolyne);
- 2. mikrocentrifugirka nastavka: vanjo smo odpipetirali 500 µl hladnega RPW-pufra za izpiranje DNA (že predhodno dodana 2-propanol in RNaza);
- 3. in 4. mikrocentrifugirka nastavka: vanju smo odpipetirali 500 µl 96-odstotnega etanola;
- 5. mikrocentrifugirka nastavka: vanjo smo odpipetirali 250 µl hladnega TE-pufra [10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)].

Od vseh uporabljenih reagentov 2-propanol, etanol in TE-pufer niso bili priloženi v uporabljenem kitu. Po končanem pipetiranju in pripravljenem polnem stojalu, ki je omogočalo istočasno izolacijo DNA iz 15 vzorcev, smo zagnali program na robotu za izolacijo rastlinske DNA, ki je trajal dvajset minut in je vključeval naslednje stopnje:

- vezavo DNA na magnetne delce (4 minute);
- spiranje v alkohol vsebujočem pufru (3,5 minute);
- dvakratno spiranje v etanolu (4,5 minute);
- sušenje (5 minut);
- spiranje DNA, ki je končno raztopljen v TE-pufu (3 minute).

Po opisanem postopku smo pridobili DNA ustrezne kakovosti in v zadostni količini, za nadaljnje analize pa smo jo shranili pri -20°C .

3.1.5 Merjenje koncentracije DNA

Koncentracijo DNA smo izmerili s fluorometrom DyNA Quant 200 (Amersham) po navodilih proizvajalca. Za delovno raztopino smo uporabili filtrsko steriliziran 1X TNE-pufer [10 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 7,4], ki smo mu dodali barvilo Hoechst H 33258 v koncentraciji 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (iz založne raztopine s koncentracijo 1 mg/ml). Za umeritev aparata smo uporabili DNA telečjega priželjca v koncentraciji 100 ng/ μl (raztopina pripravljena v 1X TNE-pufu). Na podlagi izmerjenih vrednosti smo vzorce DNA redčili v dvakrat destilirani vodi do koncentracije 20 ng/ μl . Redčitve smo nato shranili v hladilniku pri 4°C .

3.1.6 Analiza mikrosatelitnih markerjev

3.1.6.1 Izbor mikrosatelitnih markerjev

Mikrosateliti so se izkazali za posebej učinkovito molekularno orodje za razločevanje tako na nivoju vrst kot tudi sort znotraj družine Brassicaceae (Hasan in sod., 2006; Elling in sod., 2009; Elling in sod., 2010; Pascher in sod., 2010). Za namnoževanje mikrosatelitnih markerjev v PCR-postopku smo uporabili 45 predhodno objavljenih parov začetnih oligonukleotidov, ki izvirajo iz različnih vrst iz družine križnic ter vključujejo enostavno (popolno in prekinjeno) in sestavljeno strukturo osnovnega motiva z di-, tri- in tetranukleotidnim zaporedjem (preglednica 3). V preliminarno analizo smo sicer vključili 49 parov začetnih oligonukleotidov, vendar so se štirje izmed njih izkazali za neustrezne, zato smo jih iz analize izključili.

Preglednica 4: Mikrosatelitni markerji, uporabljeni v analizi genetske raznolikosti

Ime lokusa, vrsta, iz katere mikrosatelitni lokus izvira (I), zaporedja parov začetnih oligonukleotidov, osnovni mikrosatelitni motiv in število ponovitev (OMP), pričakovana dolžina namnoženih mikrosatelitnih lokusov (D), fluorescentna značka univerzalnega začetnega oligonukleotida M13(-21) (FL) in referenca objavljenih zaporedij začetnih oligonukleotidov (Ref.). ¹ 1 – Lowe in sod., 2004; 2 – Szewc-McFadden in sod., 1996; 3 – Uzanova in Ecke, 1999; 4 – Suwabe in sod., 2002; 5 – Kresovich in sod., 1995; 6 – Wang in sod., 2007.

Table 4: Microsatellite markers used in analysis of genetic diversity

Locus name, focal species (I), primer pair sequences, microsatellite motif and repeat type (OMP), expected size of the microsatellite locus (D), fluorescent label of universal primer M13(-21) (FL) and reference of the published primer pair sequences (Ref.). ¹ 1-Lowe et al., 2004; 2-Szewc-McFadden et al., 1996, 3- Uzanova in Ecke, 1999, 4-Suwabe et al., 2002; 5-Wang et al., 2007.

Št.	Ime lokusa	I	Nukleotidna zaporedja parov začetnih nukleotidov v smeri 5'-3'	OMP	D [bp]	FL	Ref ¹
1	Na12-A07	<i>B. napus</i>	1: TCAAAGCCATAAAGCAGGTG 2: CATCTTCAACACGCATACCG	(GT/CA) ₁₁	158	FAM	1
2	Na12-B05	<i>B. napus</i>	1: CAAATATCCGTCATCGGAGC 2: CCTGCGGGATATTGAAGACC	(GA/CT) ₁₈	136	NED	1
3	Na12-C08	<i>B. napus</i>	1: GCAAACGATTTGTTTACCCG 2: CGTGTAGGGTGATCTAGATGGG	(GA/CT) ₅₀	333	HEX	1
4	Na12-E05	<i>B. napus</i>	1: CGTATGTTTGTTCACCTGC 2: ACTAGCAACCACAACGGACC	(GT/CA) ₁₀	156	FAM	1
5	Na12-G05	<i>B. napus</i>	1: CCGATCATACCTTTTACTCTAGC 2: GATGTTCCTCTCGGTGATGC	(GA/CT) ₅₀	208	NED	1
6	Na14-E11	<i>B. napus</i>	1: TCATCCTTCTCACACCAAAATC 2: CCTCGAAATAGCTCCAACCC	(GA/CT) ₂₉	138	HEX	1
7	Na14-G02	<i>B. napus</i>	1: TTCCCTTTATTGAGCAAGCTG 2: TCCCGGTCGCTAAGATATTG	(GA/CT) ₁₇	189	FAM	1
8	Ni3-G04b	<i>B. nigra</i>	1: ATACTCGGGATAGGTGTGCG 2: CATGTGGCAATCCTACATTTAC	(GA/CT) ₁₈	123	NED	1
9	Ni4-D09	<i>B. nigra</i>	1: AAAGGACAAAGAGGAAGGGC 2: TTGAAATCAAATGAGAGTGACG	(GA/CT) ₂₅	206	HEX	1
10	Ni4-E08	<i>B. nigra</i>	1: GATTTTGAGGAAGCGGAGG 2: CAAAGCACTGAGAGAGAGAGAGAG	(GA/CT) ₄₇	142	FAM	1
11	Na12-A08	<i>B. napus</i>	1: AACACTTGCAACTTCATTTTCC 2: CATTGGTTGGTGAATTGACAG	(GA/CT) ₂₈	156	NED	1
12	Na12-E06a	<i>B. napus</i>	1: TGGGTTGACTACTCGGTCCCT 2: TGTCATTTTGGCTCATTCTTG	(GA/CT) ₂₃	194	HEX	1
13	Na12-C06	<i>B. napus</i>	1: AACGGATGAAGAACACATTGC 2: TAGGGCCTGTTATTTCGATGG	(GA/CT) ₃₇	204	FAM	1
14	Na10-A08	<i>B. napus</i>	1: CATGGTTAAAACAATGGCCC 2: CAAGAAACACCATCATTTCTCA	(GA/CT) ₂₁	167	NED	1
15	Na14-H11	<i>B. napus</i>	1: GGATGTTTTACAGACCCTG 2: CTTTGCAGGTATGAACACGC	(GT/CA) ₁₀	127	HEX	1

Se nadaljuje.

Nadaljevanje.

Št.	Ime lokusa	I	Nukleotidna zaporedja parov začetnih nukleotidov v smeri 5'-3'	OMP	D [bp]	FL	Ref ¹
16	BN83B1	<i>Brassica</i> sp.	1: GCCTTTCTTCACAACTGATAGCTAA 2: TCAGGTGCCTCGTTGAGTTC	(GA) ₁₁ (AAG) ₄	186	FAM	2
17	MR183	<i>Brassica</i> sp.	1: GAAATCATTCAATGCTCTGA 2: GTAAAAATCCCAATCAATGG	(TG) ₁₁	89	NED	3
18	Ni4-G04	<i>B. nigra</i>	1: GAGGCGCGTGGACTAACC 2: TTACACCCCATCCAACTCC	(GA/CT) ₆₀	315	HEX	1
19	Ni4-H04	<i>B. nigra</i>	1: CAAGAAAGGGTATTGCGTCG 2: TGTTTTAGAAATGGTATGCCCC	(GT/CA) ₁₄	172	FAM	1
20	Ol10-D03	<i>B. oleracea</i>	1: GCCAAAGACCTCAAAGATGG 2: AAGCCACGTGAAGAAAGTCC	(GA/CT) ₂₀	131	NED	1
21	Ol11-D12	<i>B. oleracea</i>	1: CCTCCACCGCACTCAATTAC 2: TGGAGAAGTTTGGGACATTTTC	(GA/CT) ₅₂	165	HEX	1
22	Ol11-G11	<i>B. oleracea</i>	1: GTTGCGGCGAAACAGAGAAG 2: GAGTAGGCGATCAAACCGAG	(GGC/CCG) ₅	132	FAM	1
23	Ol11-H02	<i>B. oleracea</i>	1: TCTTCAGGGTTTCCAACGAC 2: AGGCTCCTTCATTTGATCCC	(AAT/AAG) ₁₈	189	NED	1
24	Ol12-A04	<i>B. oleracea</i>	1: TGGGTAAGTAACTGTGGTGGC 2: AGAGTTCGCATACTCTGGAGC	(GA/CT) ₁₇	144	HEX	1
25	Ol12-B05	<i>B. oleracea</i>	1: GGAAAGCGAAGAGTGACGAC 2: ATTGGGTAAAGCTGTGCTCG	(GA/CT) ₃₆	177	FAM	1
26	Ol12-D05	<i>B. oleracea</i>	1: TCCATGACCAACGACAAGGTC 2: AAGAGGCGACTTCTATTGCG	(GA/CT) ₃₂	123	NED	1
27	Ol12-D09	<i>B. oleracea</i>	1: CGAGCTGAAGTGGATATTCG 2: ACTCGCTTTTACCGTCGTC	(GGC/CCG) ₄	134	HEX	1
28	Ol12-E03	<i>B. oleracea</i>	1: CTTGAAGAGCTTCCGACACC 2: GACGGCTAACAGTGGTGGAC	(GGC/CCG) ₉	117	FAM	1
29	Ol12-F11	<i>B. oleracea</i>	1: AAGGACTCATCGTGCAATCC 2: GTGTCAGTGGCTACAGAGAC	(GT/CA) ₁₄	233	NED	1
30	Ol13-E08	<i>B. oleracea</i>	1: TTCGCAACTCCTCCTAGAATC 2: AAGGTCTCACCACCGGAGTC	(GA/CT) ₁₁	171	HEX	1
31	Ra2-A01	<i>B. rapa</i>	1: TTCAAAGGATAAGGGCATCG 2: TCTTCTTCTTTTGTGTCTTCCG	(GA/CT) ₁₉	124	FAM	1
32	Ra2-A10	<i>B. rapa</i>	1: CCAGTGTGTGTGTGTGTGTG 2: TTTAACAGATAGCGCAGTGGTC	(GT/CA) ₁₀₇	239	NED	1

Se nadaljuje.

Nadaljevanje.

Št.	Ime lokusa	I	Nukleotidna zaporedja parov začetnih nukleotidov v smeri 5'-3'	OMP	D [bp]	FL	Ref ¹
33	Ra2-E03	<i>B. rapa</i>	1: AGGTAGGCCCATCTCTCTCC 2: CCAAACTTGCTCAAAACCC	(GA/CT) ₁₈	279	HEX	1
34	Ra2-E04	<i>B. rapa</i>	1: ACACACAACAAACAGCTCGC 2: AACATCAAACCTCTCGACGG	(GA/CT) ₁₉	140	FAM	1
35	Ra2-E12	<i>B. rapa</i>	1: TGTCAGTGTGTCCACTTCGC 2: AAGAGAAACCCAATAAAGTAGA ACC	(GA/CT) ₃₂	189	NED	1
36	Ra2-F11	<i>B. rapa</i>	1: TGAAACTAGGGTTTCCAGCC 2: CTTCAACCATGGTTTGTCCC	(GA/CT) ₃₄	240	HEX	1
37	Ra2-G09	<i>B. rapa</i>	1: ACAGCAAGGATGTGTTGACG 2: GATGAGCCTCTGGTTCAAGC	(GA/CT) ₁₉	243	FAM	1
38	Ra3-E05	<i>B. rapa</i>	1: TTCTCATGCTCCAACCACAG 2: GTTCTTCCAAGCCAAGCTG	(GT/CA) ₆₅	300	NED	1
39	Ra3-H10	<i>B. rapa</i>	1: TAATCGCGATCTGGATTAC 2: ATCAGAACAGCGACGAGGTC	(GA/CT) ₂₃	141	HEX	1
40	BRMS-036	<i>Brassica</i> sp.	1: GGTCCATTCTTTTTGCATCTG 2: CATGGCAAGGGGTAACAAACAT	(CA) ₁₀ (GA) ₄	136	FAM	4
41	BRMS-050	<i>Brassica</i> sp.	1: AACTTTGCTTCCACTGATTTTT 2: TTGCTTAACGCTAAATCCATAT	(AAT) ₄ (TC) ₁₉ (TTC) ₃	186	NED	4
42	MR187	<i>Brassica</i> sp.	1: GAGTTTTGGTTCCACCATTA 2: CCCTTCAGCCTTTGATAAAT	(AG) ₂₃ (AGG) ₅	146	HEX	3
43	BN6A2	<i>Brassica</i> sp.	1: CTTTGTGTGGACTTTTAGAACTT TA 2: CGCAGCTTTTGGCCACCTG	(GATT) ₄	96	FAM	2
44	RES1	<i>R. sativus</i>	1: CTTTCGGCATCGATTTCGT 2: TCTTCCTTGGGGAGAGGC	(CCT) ₅	166	NED	5
45	RES6	<i>R. sativus</i>	1: GATTAAGGAGAAGCTTCCAGG 2: GGAAAGCTGAAATCAACAAAGG	(ATG) ₇	196	HEX	5

Analizo z uporabo 45 mikrosatelitnih markerjev smo opravili pri vseh vzorcih vrste *B. napus* in njenih SKS-jev s terena, zbranih v štiriletnem časovnem obdobju, ter pri vseh referenčnih genotipih vrste *B. napus*, razen pri obeh kolerabah ('Hofmanova rumena' in 'Rumena maslena') ter pri krmni ('Viva') in oljni obliki ('Bienvenue'). Pri slednjih in pri referenčnih genotipih SKS-jev vrste *B. napus* (opisanih v preglednici 3) smo analizo z mikrosatelitnimi markerji opravili na podlagi 15 izbranih lokusov, ki so se v preliminarnih analizah izkazali kot najbolj informativni in optimalni za vrednotenje sorodnosti in genetske raznolikosti znotraj družine Brassicaceae. Omenjenih 15 lokusov je v preglednici 4 opisanih pod zaporednimi številkami 1, 3, 8, 9, 14, 16, 19, 26, 28, 30, 31, 35, 39, 41 in 42.

3.1.6.2 Fluorescentno označevanje začetnih oligonukleotidov

Za fluorescentno označevanje namnoženih fragmentov smo uporabili modificiran protokol ekonomske metode s »fluorescentnimi repi«, ki jo je opisal Schuelke (2000). Gre za poseben postopek fluorescentnega označevanja začetnih oligonukleotidov, kjer v PCR-

analizo dodamo še tretji, univerzalni začetni oligonukleotid (M13(-21)), ki ima na 5'-koncu fluorescentno oznako, ki služi za označevanje dolžin namnoženih fragmentov v PCR-analizi. Univerzalno zaporedje M13(-21) je enako zaporedju repa, ki smo ga predhodno pripeli (v procesu sinteze začetnih oligonukleotidov) enemu od vsakega para začetnih oligonukleotidov (v preglednici 4 označenemu z zaporedjem 1) na 5'-konec. To je 18 bp dolgo zaporedje (5'-TGTAACGACGCGCCAGT-3'), ki mu je bilo treba prilagoditi tudi pogoje in sam potek PCR-analize (opis v točki 3.3.4.3). Univerzalni začetni oligonukleotid M13(-21) je bil označen s tremi različnimi fluorescentnimi značkami, ki smo jih dodelili posameznemu paru začetnih oligonukleotidov (preglednica 4). Zaradi njihovih različnih spektralnih značilnosti smo izbrali barvila s komercialnimi imeni, FAM, NED in HEX, kar je omogočalo simultano ločevanje kombinacije treh različnih lokusov v fragmentni analizi. Tako smo v PCR-analizo poleg para začetnih oligonukleotidov, kjer je bil prvi opremljen z dodatnim 18 bp dolgim repom, dodali še univerzalni začetni oligonukleotid z različnimi fluorescentnimi značkami – FAM-M13(-21), NED-M13(-21) in HEX-M13(-21).

3.1.6.3 PCR-analiza

Reakcije namnoževanja 45 mikrosatelitnih markerjev smo pripravili v končnem volumnu 11,5 µl in so vsebovale:

- 30 ng genomskega DNA;
- 10X PCR-puffer (Biotools);
- 10 mM koncentracijo vsakega deoksinukleotida trifosfata (Promega);
- 50 mM MgCl₂ (Biotools);
- 10 µM vsakega začetnega oligonukleotida, kjer je prvemu od para na 5'-koncu dodano 18 bp dolgo zaporedje (Sigma Aldrich) (opis v točki 3.3.4.2);
- 10 µM univerzalnega fluorescentnega začetnega oligonukleotida FAM-M13(-21) ali NED-M13(-21) ali HEX-M13(-21) (Applied Biosystems);
- 0,5 enote *Taq* DNA-polimeraze (Biotools).

PCR-analize smo izvedli v cikličnem termostatu ATC 401 (Apollo Instrumentation). Glede na to, da smo v PCR-analizo vključili 45 različnih parov začetnih oligonukleotidov, pri čemer je imel vsak par svoje zahteve za uspešno namnoževanje, smo stremeli k temu, da PCR-pogoje skupno čim bolj prilagodimo tako, da bodo ustrezali njihovim temperaturnim zahtevam. Pri optimizaciji PCR-pogojev smo zato uporabili protokol, kjer v fazi prileganja začetnih oligonukleotidov temperatura v vsakem naslednjem ciklu narašča (angl. »touch-down protocol«). Poleg tega smo pri optimizaciji PCR-pogojev upoštevali tudi temperaturne zahteve univerzalnih začetnih oligonukleotidov FAM-M13(-21), NED-M13(-21) in HEX-M13(-21) tako, da smo standardnemu 3-stopenjskemu PCR-profilu dodali dodatno stopnjo (opisano spodaj), kjer lahko univerzalni začetni oligonukleotid vgrajuje fluorescentne molekule M13(-21) v namnožene PCR-fragmente. Ta proces pa omogoča lasersko določitev namnoženih mikrosatelitnih lokusov na sekvenatorju, ki deluje po principu kapilarne elektroforeze. Prav zato je le ustrezno nastavljen PCR-temperaturni profil za posamezen lokus dovolj dobra osnova za primerno berljive rezultate fragmentne analize, opravljene na sekvenatorju (opis postopka v točki 3.3.4.4.). Glede na vse temperaturne zahteve vseh začetnih oligonukleotidov smo v doktorski disertaciji uporabili spodnje štiri temperaturne PCR-profile.

- A. Temperaturne nastavitve v PCR-analizi za lokuse v preglednici 4 pod zaporednimi številkami 1, 3, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 in 45:
- začetna 4-minutna denaturacija pri 94 °C;
 - 15 ciklov s ponavljanjem:
 - a) 1 minuta pri 94 °C,
 - b) 1 minuta pri 49,5 °C, pri čemer se v vsakem ciklu temperatura dvigne za 0,7 °C,
 - c) 1 minuta pri 72 °C;
 - 23 ciklov s ponavljanjem:
 - a) 30 sekund pri 94 °C,
 - b) 30 sekund pri 53 °C,
 - c) 1 minuta pri 72 °C;
 - zaključna 5-minutna elongacija pri 72 °C;
 - ohlajanje in vzdrževanje temperature na 4 °C.
- B. Temperaturne nastavitve v PCR-analizi za lokuse v preglednici 4 pod zaporednima številkami 8 in 18:
- začetna 4-minutna denaturacija pri 94 °C;
 - 15 ciklov s ponavljanjem:
 - a) 1 minuta pri 94 °C,
 - b) 1 minuta pri 51,5 °C, pri čemer se v vsakem ciklu temperatura dvigne za 0,7 °C,
 - c) 1 minuta pri 72 °C;
 - 23 ciklov s ponavljanjem:
 - a) 30 sekund pri 94 °C,
 - b) 30 sekund pri 53 °C,
 - c) 1 minuta pri 72 °C;
 - zaključna 5-minutna elongacija pri 72 °C;
 - ohlajanje in vzdrževanje temperature na 4 °C.
- C. Temperaturne nastavitve v PCR-analizi za lokuse v preglednici 4 pod zaporednimi številkami 2, 4, 5 in 6:
- začetna 4-minutna denaturacija pri 94 °C;
 - 15 ciklov s ponavljanjem:
 - a) 1 minuta pri 94 °C,
 - b) 1 minuta pri 53,5 °C, pri čemer se v vsakem ciklu temperatura dvigne za 0,7 °C,
 - c) 1 minuta pri 72 °C;
 - 23 ciklov s ponavljanjem:
 - a) 30 sekund pri 94 °C,
 - b) 30 sekund pri 54 °C,
 - c) 1 minuta pri 72 °C;
 - zaključna 5-minutna elongacija pri 72 °C;
 - ohlajanje in vzdrževanje temperature na 4 °C.
- D. Temperaturne nastavitve v PCR-analizi za lokuse v preglednici 4 pod zaporednima številkami 10 in 32:
- začetna 5-minutna denaturacija pri 94 °C;
 - 13 ciklov s ponavljanjem:
 - a) 30 sekund pri 94 °C,
 - b) 30 sekund pri 52 °C, pri čemer se v vsakem ciklu temperatura dvigne za 1,0 °C,

- c) 30 sekund pri 72 °C;
- 27 ciklov s ponavljanjem:
 - a) 30 sekund pri 94 °C,
 - b) 30 sekund pri 52 °C,
 - c) 30 sekund pri 72 °C;
- zaključna 7-minutna elongacija pri 72 °C;
- ohlajanje in vzdrževanje temperature na 4 °C.

Po končani PCR-analizi smo PCR-produkte shranili na 4 °C.

3.1.6.4 Fragmentna analiza

Fragmentno analizo smo izvajali na genetskem analizatorju 3130XL Geneteic Analyzer (Applied Biosystems), ki deluje po principu kapilarne elektroforeze. Elektroforetsko ločevanje lokusov je potekalo v kapilari (skupno jih sistem vsebuje 16), dolgi 47 cm, z gelom POP-4 (angl. Performance Optimized Polymers), ki je primeren za analizo mikrosatelitov. Sistem omogoča avtomatsko lasersko določitev fragmentov na podlagi njihove fluorescence. Signale različnih valovnih dolžin oddajajo fluorescentne molekule FAM-M13(-21), NED-M13(-21) in HEX-M13(-21), ki so predhodno v PCR-analizi vgrajene v namnožene fragmente, kar omogoča odčitavanje alelnih dolžin mikrosatelitnih lokusov (prek »Charge-Coupled Device« kamere) glede na dolžinski standard ROX, ki je dodan vsakemu vzorcu posebej. Fluorescentne značke s komercialnimi imeni FAM, NED, HEX in ROX, uporabljene za analizo mikrosatelitov, spadajo v tako imenovani skupino (set) značk druge generacije.

Kot je opisano v točkah 3.3.4.2 in 3.3.4.3, smo v PCR-analizi uporabili tri univerzalne začetne oligonukleotide – FAM-M13(-21), NED-M13(-21) in HEX-M13(-21); tri različne lokuse s tremi različnimi fluorescentnimi značkami smo zato lahko združili v en vzorec v fragmentni analizi (angl. post-PCR multiplexing). Vsakemu vzorcu smo dodali tudi molekularni standard znanih dolžin, ROX-350 (Applied Biosystems), ki vsebuje fragmente, dolge 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340 in 350 bp.

Zaradi velike količine vzorcev in velikega števila mikrosatelitnih lokusov je priprava vzorcev za fragmentno analizo zahtevala poseben sistem združevanja PCR-produktov in primerno označevanje posameznih vzorcev. Vzorce za fragmentno analizo smo pripravljali v 96-mestni plošči (Sarstedt), en vzorec pa je vseboval naslednje sestavine:

- 7 µl formamida Hi-Fi (Applied Biosystems);
- 0,4 µl molekularnega dolžinskega standarda GeneScan 350 ROX Size Standard (Applied Biosystems);
- po 1,5 µl vsakega od treh PCR-produktov z različnimi fluorescentnimi oznakami (lokusi).

Po končanem pipetiranju smo celotno ploščo pokrili s pripadajočimi gumijastimi pokrovi (Applied Biosystems), na hitro centrifugirali (angl. short spin down) (Tehtnica PLC-322) in nato izpostavili denaturaciji pri 95 °C za dve minuti (ciklični termostat GeneAmp 9700, Applied Biosystems). Po končani denaturaciji smo celotno ploščo takoj položili na led, vzorce pa smo do fragmentne analize hranili na 4 °C.

Rezultate fragmentne analize na sekvenatorju ABI 3130 XL (Applied Biosystems) nam je podporni programski paket GeneScan (Applied Biosystems) podal v obliki elektroferogramskih datotek FSA, ki smo jih prenesli v programski paket GeneMapper 4.0, ki omogoča napredno branje in analizo rezultatov. Odčitavanje alelnih dolžin na analiziranih lokusih smo v tem programu opravili prek dejanske prisotnosti alelov na posameznem lokusu, in sicer glede na vzorec ponavljajočega se mikrosatelitnega motiva. Sledilo je odčitavanje rezultatov na 2n- in 4n-nivoju, torej glede na to, ali sta bila na istem lokusu pri istem vzorcu prisotna dva oziroma štirje aleli. Vse odčitke alelnih dolžin smo preverili tako, da smo dodatno izločili tudi morebitne lažne signale oziroma šume. Zaradi uporabe metode z univerzalnim fluorescentnim začetnim oligonukleotidom so bili odčitki alelnih dolžin pri vseh vzorcih v analizi za 18 bp daljši (zaporedje, ki smo ga pri sintezi dodali prvemu od vsakega para začetnih oligonukleotidov) od dejanskih dolžin. Podatke o dolžinah alelov smo nato uvozili v program MS Excel, jih tam uredili in oblikovali v osnovne formate, ki so bili predpripravljeni za vhodne datoteke v nadaljnjih statističnih obdelavah, vrednotenju genetske raznolikosti in prikazih rezultatov.

3.2 VREDNOTENJE GENETSKE RAZNOLIKOSTI IN STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV

3.2.1 Obdelava rezultatov na diploidnem nivoju

3.2.1.1 Vrednotenje uporabljenih mikrosatelitnih markerjev za analizo genetske raznolikosti in izračuni F-statistike

Mikrosatelitne markerje smo vrednotili na osnovi različnih parametrov genetske variabilnosti. S pomočjo programa Microsatellite Toolkit (Park, 2001) smo za posamezen lokus izračunali frekvence posameznih alelov (p_i) in informacijsko vrednost polimorfizma (PIC), ki ovrednoti informativnost lokusa in nakaže, če je ta primeren za gensko kartiranje. Obe vrednosti smo izračunali po spodnjih formulah:

$$p_i = \frac{\text{pogostost } i\text{-tega alela v populaciji}}{\text{pogostost vseh alelov v populaciji}} \quad \dots(1)$$

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2 \quad (\text{Anderson in sod., 1993}) \quad \dots(2)$$

Za vsak lokus smo z računalniškim programom Identity 1.0 (Wagner in Sefc, 1999) izračunali število alelov (N), frekvenco ničtih alelov (N_0), pričakovano in dejansko heterozigotnost (H_e in H_o) ter verjetnost enakosti genotipov (PI), ki je v molekularni ekologiji pomemben parameter za določitev minimalnega števila genetskih označevalcev za uspešno razločevanje čim večjega števila genotipov. Omenjene parametre variabilnosti smo izračunali po naslednjih formulah:

$$N_0 = \frac{H_e - H_o}{1 + H_e} \quad (\text{Brookfield, 1996}) \quad \dots(3)$$

$$H_o = \frac{\text{število heterozigotnih posameznikov}}{N \text{ (število osebkov v populaciji)}} \quad (\text{Nei, 1973}) \quad \dots(4)$$

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 \quad (\text{Nei, 1973}) \quad \dots(5)$$

$$P_I = 2 \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right)^2 - \sum_{i=1}^n p_i^4 \quad (\text{Paetkau in sod., 1995}) \quad \dots(6)$$

Sorodstvene koeficiente Wrightove F-statistike (Fis, Fit in Fst) (Wright, 1951) smo za posamezen lokus glede na populacije izračunali v računalniškem programu GenAlEx 6.4.1 (Peakall in Smouse, 2006) po naslednjih formulah:

$$F_{is} = \frac{\overline{H_e} - H_o}{\overline{H_e}} \quad \dots(7)$$

$$F_{it} = \frac{H_t - \overline{H_o}}{H_t} \quad \dots(8)$$

Ht predstavlja skupno pričakovano heterozigotnost na lokusu, izračunano kot:

$$H_t = 1 - \sum_{i=1}^k \overline{p_i}^2 \quad \dots(9)$$

$$F_{st} = \frac{H_t - \overline{H_e}}{H_t} \quad \dots(10)$$

3.2.1.2 Stopnja genetske raznolikosti in populacijska statistika

Genetska raznolikost znotraj populacije je ključen parameter v evolucijski in ohranjevalni biologiji. Najbolj osnovna mera genetske raznolikosti na posameznem lokusu je število različnih alelov (R; angl. allelic richness), neodvisno od velikosti populacije, ki smo jo ocenili v računalniškem programu Fstat 2.9.3.2 (Goudet, 2002) po naslednji formuli:

$$R = \sum_{i=1}^k \left(1 - \frac{C_{2N-N_i}^{2n}}{C_{2N}^{2n}} \right) \quad (\text{Petit, 1998}) \quad \dots(11)$$

N_i je število i -tega alela v populaciji velikosti N , n je število osebkov, analiziranih v najmanjši populaciji v analizi, in k predstavlja število alelov na analiziranem lokusu. Povezovalna statistika v tej vrednosti je število privatnih alelov (N_p ; angl. number of private alleles) oziroma alelov, značilnih za posamezno populacijo, ki pa je osnovna mera genetske značilnosti posamezne populacije. Poleg tega so k oceni stopnje genetske raznolikosti in evolucije pripomogli tudi spodaj omenjene mere in indeksi. Znotraj populacijske genetske primerjave ter primerjave genetske raznolikosti med posameznimi samosevnimi in podivjanimi populacijami ter z referenčnimi genotipi smo v računalniškem programu GenAlEx 6.4.1 (Peakall in Smouse, 2006) na osnovi pojavljanja alelnih vzorcev v posamezni populaciji z naslednjimi parametri populacijske genetske variabilnosti izračunali:

- števila in frekvence različnih alelov (N_a in p_i);
- alelne raznolikosti in učinkovitosti (N_e ; angl. number of effective alleles) po formuli:

$$N_e = \frac{1}{1 - H_e} \quad \dots(12)$$

- števila privatnih alelov oziroma število alelov, značilnih za posamezno populacijo (N_p);
- števila lokalno skupnih alelov, ki se v analizi s frekvenco več kot 5 % pojavljajo v 25 ali manj % populacij, in števila lokalno skupnih alelov, ki se v analizi s frekvenco več kot 5 % pojavljajo v 50 ali manj % populacij;
- deleža polimorfnih lokusov v posamezni populaciji (P).

Genetsko izenačenost znotraj populacij in primerjavo genetske variabilnosti med populacijami smo izračunali na osnovi povprečnih vrednosti Shanonnovega informacijskega indeksa (I) po naslednji formuli:

$$I = - \sum_{i=1}^n p_i \ln p_i \quad \dots(13)$$

Populacijsko genetsko raznolikost smo ovrednotili na osnovi deleža heterozigotnosti (H_o – obravnavane, H_e – pričakovane, H_n . b. – nepristransko pričakovane, brez vpliva majhne populacije) v posamezni populaciji po naslednji formuli:

$$H_n. b. = H_e \left(\frac{2N}{2N-1} \right) \quad (Nei, 1978) \quad \dots(14)$$

Sorodstvene indekse F_{is} , F_{st} in F_{it} iz točke 3.2.1.1.1 smo za vse lokuse izračunali v vsaki analizirani populaciji, saj smo želeli pridobiti širšo sliko o značilnostih populacij na vseh analiziranih lokusih hkrati. Na podlagi izračunov H_i -kvadrat testov (formula številka 15) smo za vsako kombinacijo genotip–loкус preverili odstopanje od Hardy-Weinbergovega ravnotežja (opis v točki 3.2.1.1.3).

$$X^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(O-E)^2}{E} \quad \dots(15)$$

V sklopu multivariatnih statističnih metod, ki predstavljajo glavno orodje za proučevanje genetske raznolikosti, smo v korespondenčni analizi uporabili metodo glavnih koordinat (PCoA) in faktorsko korespondenčno analizo (FCA). PCoA-analiza je metoda za odkrivanje strukture v naboru mikrosatelitnih podatkov, pri čemer geometrijske razdalje med posameznimi genotipi na dvo- ali trodimenzionalnem razsevnem grafikonu odražajo genetske razdalje z minimalnim odstopanjem. PCoA-analizo smo na dvodimenzionalni ravni izvedli v računalniškem programu GenAlEx 6.4.1 (Peakall in Smouse, 2006), pri čemer smo kot vhodni podatek uporabili kovariančno matriko parnih genetskih primerjav dolžin alelov. FCA-analiza prav tako ponuja interpretacije povezav med vrsticami in stolpci v matriki, kar v populacijski genetiki pomeni asociacije med aleli na posameznih mikrosatelitnih lokusih z genotipi. Skupni delež celotne variance lahko pojasni že dvo- ali trodimenzionalni grafikon, torej dva ali trije po vrednosti največji dejavniki. Zaradi

interpretacije samo določenega dela celotne korespondenčne analize to metodo imenujemo tudi FCA-analiza, ki smo jo za analizirane genotipe izvedli v računalniškem programu Genetix (Belkhir in sod., 1999).

3.2.1.3 Genetska razdalja in struktura populacij

Parametri F-statistike (Wright, 1951) ali indeksi fiksacij vseh populacij na vseh lokusih se uporabljajo kot ocena nedoločenega evolucijskega modela alelov, kar smo izračunali s pomočjo alelne distančne matrike. Indeksi fiksacij opisujejo odstopanja od Hardy-Weinbergovega ravnotežja znotraj posameznih populacij (F_{it}), med njimi (F_{st}) in znotraj njih (F_{is}) ter jih izračunamo po naslednjih formulah:

$$F_{it} = \frac{A_i + A_p}{W_i + A_i + A_p} \quad \dots(16)$$

A_p je ocena variabilnosti med populacijami, A_i je ocena variabilnosti med posameznimi genotipi in W_i je ocena variabilnosti znotraj genotipov.

$$F_{is} = \frac{A_i}{W_i + A_i} \quad \dots(17)$$

$$F_{st} = \frac{A_p}{W_i + A_i + A_p} \quad \dots(18)$$

O je obravnavano število i -tega genotipa, E pa predstavlja pričakovano število i -tega genotipa. Če vrednosti fiksacijskih indeksov niso statistično značilne (99 permutacijskih ponovitev), so genotipi oziroma populacije v ravnotežju. Tiste populacije oziroma genotipi, pri katerih je fiksacijski indeks statistično značilen (z verjetnostjo $p = 0,05$, $p = 0,01$, $p = 0,001$), pa niso v ravnotežju. Neravnotežje je pričakovano pri populacijah/genotipih, za katere je znan genetski vnos tujih oblik sorodnih rastlin/genov, pri čistih populacijah pa pojav neravnotežja ni pričakovan.

Razporeditev molekulske raznolikosti med posameznimi genotipi smo ocenili na podlagi analize molekulske variance (AMOVA) na dveh ravneh: brez predhodnih razporeditev v skupine in s predhodnim razvrščanjem v skupine, in sicer glede na uporabnost genotipov oziroma pojavnost (odvisno od analize) v računalniškem programskem paketu Arlequin (Excoffier in Lischer, 2010). Statistično značilnost vrednosti smo ovrednotili s permutacijskim testom (1000 ponovitev). V tem programu smo izračunali tudi pripadajoče indekse fiksacij, in sicer kot mero genetske raznolikosti med genotipi sort in rodov znotraj skupin (F_{sc}) ter kot genetsko raznolikost sort in rodov med posameznimi skupinami (F_{ct}). Analizo AMOVA na podlagi F-statistike, ki upošteva nedoločen alelni model v primeru alelne enakosti oziroma različnosti (angl. infinite alleles model), in analizo AMOVA na podlagi stopenjskega mutacijskega modela, ki upošteva varianco v dolžinah alelov (angl. step-wise mutational model), smo opravili v računalniških programih GenAlEx 6.4.1 (Peakall in Smouse, 2006). Statistično značilnost vrednosti R_{st} in F_{st} smo ovrednotili s permutacijskim testom (999 ponovitev).

Genetske povezave med posameznimi genotipi in populacijami na osnovi razdalje skupnih alelov (DAS) (Chakraborty in Jin, 1993) ter standardne genetske razdalje (Nei, 1972) z algoritmom netehtane aritmetične sredine (UPGMA) (Sneath in Sokal, 1973) ali z algoritmom najbližjih sosedov (NJ) (Saitou in Nei, 1987) smo v hierarhični klasterski analizi analizirali z računalniškim programom Populations (Langella, 2002). Določanje stopnje zaupanja in robustnost izračunane topologije smo ovrednotili z »bootstrap« metodo samovzorčenja oziroma z metodo vezanja ter izvedli 100 samovzorčenj za ocenjevanje kakovosti filogenetskih dreves. Za izris filogenetskih dreves smo uporabili računalniški program TreeView (Page, 1996).

Z računalniškim programom Structure 2.3.3 (Pritchard in sod., 2009) smo v klasterski analizi (apriorna klasifikacija) ovrednotili število populacijskih struktur oziroma genetskih skupin znotraj analiziranih vzorcev, pri čemer smo uporabili Bayesov pristop. Model predpostavlja obstoj K-skupin (populacij, klastrov) s specifičnimi frekvencami alelov na vsakem posameznem lokusu. Posamezniki so iz vzorca glede na genetsko strukturo dodeljeni eni oziroma več skupinam. Za izračun aposteriorne verjetnosti za izbrana K in $\ln P(D)$ program uporablja MCMC-metodo (angl. Markov Chain Monte Carlo). MCMC-metode so odvisne od konvergence Markovove verige v stacionarno porazdelitev. Iz verige vzorčenj (iteracij) zajamemo šele tedaj, ko smo zavrgli določeno število začetnih vzorcev (angl. burn-in). Tako zagotovimo, da zajemamo iz stacionarne porazdelitve. Za izračun števila skupin smo uporabili prilagojen model po Evannu (Evanno in sod., 2005), kjer smo »realno« število K (angl. real K) določili na podlagi *ad hoc* statistike. Za izračun verjetnosti števila skupin smo vedno upoštevali, da vzorci tvorijo od enega do števila populacij v analizi + tri skupine v štirih ponovitvah. Za vsako simulacijo smo uporabili 10.000 MCMC-ponovitev, pri čemer je bilo začetnih 1000 ponovitev izločenih iz analize. Po končani analizi smo izmed povprečja najvišjih vrednosti $\ln P(D)$ sukcesivno izbrali tisti K, kjer je razlika med dvema zaporednima K-jema, ki imata najvišjo povprečno vrednost $\ln P(D)$, najmanjša ter za najmanjše in najbolj izenačene (med štirimi ponovitvami) povprečne vrednosti alfa (parameter za oceno stopnje genetskih dodatkov – primesi drugih alelov v skupini) določili realno število skupin (populacij, klastrov) v vzorcu posameznih genotipov.

3.2.1.4 Vrednotenje inter- in intraspeciesnih križanj ter prenosa genov v prostoru in času

Spontan prenos in ustalitev genov v naravi med posevki, samosevnimi in podivjanimi genotipi vrste *B. napus* (intraspeciesna križanja) ter njenimi SKS-ji (interspeciesna križanja) je v prostoru in času mogoče vrednotiti predvsem z različnimi ocenami prenosa genov, stopnje tujeprašnosti, sprememb v alelni strukturi, števila genetskih migrantov, fiksacijskega indeksa F-statistike (Wright, 1946, 1951 in 1965) in genetske strukture genotipov v primerjavi z referenčnimi genotipi. Glede na to, da je bilo v doktorski disertaciji identificiranih skupno sedem lokacij, na katerih je vzorčenje predstavnikov vrste *B. napus* v štiriletnem časovnem obdobju potekalo več kot enkrat, smo na podlagi sprememb v njihovi genetski strukturi lahko primerjali zgoraj naštete parametre.

Število genetskih migrantov oziroma enoto prenosa genov (N_m ; angl. number of migrants), ki se uporablja pri karakterizaciji genetske strukture kot ocena stopnje prenosa

genov na posameznem lokusu znotraj populacij, smo izračunali v računalniškem programu GenAlEx 6.4.1 (Peakall in Smouse, 2006) po naslednji formuli:

$$Nm = \frac{\left(\frac{1}{F_{st}}\right) - 1}{4} \quad \dots(19)$$

Vzporedno smo za splošno primerjavo ocene stopnje prenosa genov med populacijami znotraj vrste *B. napus* in znotraj družine Brassicaceae v računalniškem programu GenePop 4.1.0 (Rousset, 2008) izračunali tudi vrednost *m* (stopnja prenosa genov; angl. migration rate). Ta vrednost predstavlja izboljšano oceno vrednosti *Nm* na podlagi najbližje regresijske linije, ki odraža razmerje med dvema spremenljivkama (število genetskih migrantov skozi generacije) po metodi najbližjih kvadratov (krivulje, ki se najbolj prilega podatkom) in se izračuna kot:

$$m = \frac{1 - F_{st}}{2F_{st}} \quad (\text{Barton in Slatkin, 1986}) \quad \dots(20)$$

Za določanje sprememb v genetski strukturi na posameznem lokusu smo uporabili neravnotežni islandski model, ki upošteva funkcijo časa in je neodvisen od velikosti populacije. S pomočjo islandskega modela smo na podlagi *F*-statistike določili tiste lokuse v genomu, kjer je stopnja prenosa genov med analiziranimi genotipi statistično značilna ter vpliva na njihove mikroevolucijske procese in na naravno selekcijo. Analizo smo izvedli v 20.000 simulacijskih ponovitvah v programskem paketu Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier in Lischer, 2010).

Izračun fiksacijskega indeksa (*F*) za posamezno populacijo smo opravili v računalniškem programu GenAlEx 6.4.1 (Peakall in Smouse, 2006) po naslednji formuli:

$$F = \frac{H_e - H_o}{H_e} \quad \dots(21)$$

Izračunane pozitivne *F*-vrednosti predstavljajo oceno zmožnosti oprašitve s sorodnimi genotipi oziroma prisotnost nedoločenih ničtih alelov v populaciji, vrednosti blizu 0 so pričakovane pri tistih populacijah, kjer v naravi prihaja do naključnih oprašitev, negativne *F*-vrednosti pa nakazujejo presežek heterozigotov v populaciji zaradi usmerjenih križanj (žlahtnjenja) in vpliva heterotične selekcije v populaciji.

Na podlagi transformacije *F*-vrednosti smo za posamezno populacijo izračunali oceno stopnje spontane tujeprašnosti v naravi (*t*; angl. out-crossing rate), ki ne predvideva selekcije v času oploditve in ni odvisna od fenofaze rastline, v kateri je bila genetska analiza izvedena. Izračunali smo jo v programu MS Excel po spodnji formuli (22) (Weir, 1996), pri čemer *F* predstavlja vrednost fiksacijskega indeksa (Peakall in Smouse, 2010). Vrednosti *t* segajo med 0 in 1+, pri čemer vrednosti nad 1 predstavljajo stopnjo tujeprašnosti, ki je posledica usmerjenih oprašitev s sorodnimi genotipi zaradi žlahtnjenja in selekcije (Peakall in Smouse, 2010). Vrednosti med 0 in 1 pa dejansko predstavljajo stopnjo tujeprašnosti in so tudi realne, saj vključujejo potencial za spontana križanja in prenos genov v naravi; v tem primeru znotraj tega intervala od 1 odštejmo izračunano

vrednost t in dobljeno pomnožimo s 100 % ter tako dobimo % tujeprašnosti (He in sod., 2012; Nemri in sod., 2012; Rong in sod., 2010).

$$T = \frac{(1-F)}{(1+F)} \quad \dots(22)$$

V računalniškem programu GenAIE 6.4.1 (Peakall in Smouse, 2006) smo izračunali tudi parne primerjave posameznih genotipov znotraj populacije, pri čemer smo uporabili LRM-algoritem (Lynch in Ritland, 1999), ki predstavlja dobro oceno za osebk, ki so izpostavljeni spontanemu oprašitvam v naravi v luči ohranjanja in ustalitve genov v naravnih populacijah. Uporaba tega algoritma je še posebej ustrezna v analizah, ki vključujejo veliko lokusov in genotipe, katerih izvor ni predhodno znan. Vrednosti LRM-indeksa vključujejo interval od -0,5 do +0,5.

Poleg odkrivanja realnega K-ja smo v programu Structure 2.3.3 (Pitchard in sod., 2009) proučevali tudi izvor, genetsko strukturo samosevnih in podivjanih genotipov *B. napus* ter njenih SKS-jev in njihovo pripadnost posameznemu rodu oziroma vrsti znotraj družine Brassicaceae glede na možnost prenosa genov v naravi. To oceno smo v klasterski analizi ovrednotili z vrednostjo Q , ki predstavlja oceno aposteriorne verjetnosti, da genotip pripada določeni skupini (populaciji, klastru) na določeni lokaciji v posameznem letu oziroma v zaporednih letih.

Spremembe v alelni strukturi populacij v posameznih zaporednih letih (glede na to, kako dolgo so se populacije lahko samoohranjale v naravi in koliko časa so bile izpostavljene spontanemu oprašitvam) smo vrednotili tudi na podlagi parametrov N_a , N_e , N_o , $N_c \leq 25$ in $N_c \leq 50$ iz točke 3.2.1.1.2.

Prostorsko pozicijo vseh lokacij vzorčenja v štiriletnem časovnem obdobju v obliki Gauss-Krügerjevih koordinat (X [m] in Y [m]) (kot je opisano v točki 3.1.1) smo z logaritemsko funkcijo ($\log_{10}$ [m]) iz dvojiškega preslikali v desetiški številski zapis, ki je služil kot vhodni podatek v matriki parnih genetskih primerjav za izdelavo genetske in geografske povezanosti genotipov in populacij v posameznih letih. Genetski in geografski matriki smo med sabo primerjali z Mantelovim testom (Mantel, 1967), pri čemer smo na podlagi Mantelovega korelacijskega koeficienta (r_{xy}), ki je predstavljal merilo skladnosti, ovrednotili povezanost genotipov na genetskem in prostorskem nivoju v štiriletnem časovnem obdobju. V primeru, da je korelacijski koeficient negativen ($-1 \leq r_{xy} \leq 0$), govorimo o slabih genetskih in prostorskih povezavah; pozitiven korelacijski koeficient ($0 < r_{xy} \leq 1$) pa nakazuje na dobro genetsko in prostorsko povezanost med analiziranimi genotipi. Statistično značilnost prostorskih in genetskih povezav smo preverili s testom prostorske samokorelacije (LSA; angl. Local indicator of Spatial Autocorrelation), pri čemer smo na podlagi izračunane vrednosti lokalnega indikatorja prostorske avtokorelacije (r) z 999 permutacijskimi ponovitvami ugotavljali naključnost razporeditve obravnavanih genotipov na posameznih lokacijah v prostoru za določeno časovno obdobje. Predhodno smo po metodi razdalj najbližjih sosedov (NND; angl. Nearest Neighbor Distances) določili število najbližjih sosedov (NN), ki smo ga uporabili kot vhodni parameter v avtokorelacijski analizi. Mantelov test (Mantel, 1967), NND- in LSA-analizo smo za genotipe vrste *B. napus* (posevke, samosevne in podivjane) ter za SKS-je vrste *B. napus*

(*B. rapa* in *S. arvensis*), zbrane na območju celotne Slovenije v štiriletnem časovnem obdobju, izvedli v računalniškem programu GenAlEx 6.4.1 (Peakall in Smouse, 2006).

3.2.2 Obdelava rezultatov na tetraploidnem nivoju

Pridobljene podatke iz točke 3.1.6.4 o alelnih dolžinah na 45 oziroma 15 lokusih smo za vse analizirane vzorce (498) obravnavali tudi na tetraploidnem nivoju, kar pomeni, da smo na vsakem analiziranem lokusu prebrali prisotnost štirih alelov. Eden redkih statističnih programov za obdelavo genetskih podatkov, ki v vhodni matriki sprejema n -ploidne podatke o alelnih dolžinah (kodominantne podatke), je računalniški program Structure (Pitchard in sod., 2009). Kodominantno matriko na $4n$ -nivoju smo zato pretvorili v binarno na osnovi prisotnosti posameznega alela (1–4) na posameznem lokusu, pri čemer smo z 1 označili prisotne alele, z 0 pa tiste alele, ki na posameznem lokusu niso bili prisotni. Pretvorbo smo opravili v računalniškem programu GenAlEx 6.4.1 (Peakall in Smouse, 2006), kjer smo numerične zapise prevedli v binarne. V programu MS Excel smo nato te podatke oblikovali v binarno matriko, ki je služila kot vhodni podatek za nadaljnjo statistično obdelavo genetskih podatkov.

3.2.2.1 Stopnja genetske raznolikosti

Analize genetske raznolikosti, opisane v tej točki, smo opravili v računalniškem programu GenAlEx 6.4.1 (Peakall in Smouse, 2006). Na podlagi binarnih vhodnih podatkov smo izračunali kvalitativno prisotnost posameznih alelov, ki smo jih v analizi obravnavali kot prisotnost/odsotnost fragmenta v posamezni populaciji z naslednjimi parametri populacijske genetske variabilnosti:

- števila različnih alelov, pri čemer sta q -frekvenca recesivnega alela in p -frekvenca dominantnega alela v naslednji odvisnosti:

$$q = \sqrt[3]{1 - \text{frekvenca prisotnosti fragmenta}} \quad \dots(23)$$

$$p = 1 - q \quad \dots(24)$$

- alelne raznolikosti in učinkovitosti (Neb) po formuli:

$$\text{Neb} = \frac{1}{p^2 + q^2} \quad \dots(25)$$

- deleža polimorfnih lokusov v posamezni populaciji

Genetsko izenačenost znotraj populacij in primerjavo genetske variabilnosti med populacijami smo izračunali na osnovi povprečnih vrednosti Shanonnovega informacijskega indeksa (I) po naslednji formuli:

$$I = -1(p \ln(p) + q \ln(q)) \quad \dots(26)$$

Populacijsko genetsko raznolikost smo ovrednotili na osnovi deleža pričakovane heterozigotnosti (H_e) in nepristransko pričakovane heterozigotnosti, brez vpliva majhne populacije ($H_n.b.$) v posamezni populaciji, združeni v naslednji formuli (Nei, 1978):

$$H_n.b. = H_e \left(\frac{2N}{2N-1} \right) \quad \dots(27)$$

Pri tem je

$$H_e = 2pq \quad \dots(28)$$

in N velikost populacije.

V korespondenčni analizi smo za binarne podatke uporabili PCoA-analiza na dvodimenzionalni ravni. Kot vhodni podatek smo uporabili kovariančno matriko parnih genetskih primerjav, opravljenih po metodi Huffa in sod. (1993).

3.2.2.2 Genetska razdalja in struktura populacij

V računalniškem programu FreeTree (Pavlicek in sod., 1999) smo na osnovi binarne matrike izračunali naslednje matrike koeficientov podobnosti med pari genotipov: na osnovi standardne genetske razdalje (Nei, 1972), na osnovi Diceovega koeficienta podobnosti (Nei in Li, 1979) in na osnovi Jaccardovega koeficienta podobnosti (Jaccard, 1901), in sicer z UPGMA-algoritmom (Sneath in Sokal, 1973) ali z algoritmom najbližjih sosedov (NJ) (Saitou in Nei, 1987). Določanje stopnje zaupanja in robustnost izračunane topologije smo ovrednotili z »bootstrap« metodo samovzorčenja oziroma metodo vezanja ter izvedli 100 samovzorčenj za ocenjevanje kakovosti filogenetskih dreves. Za izris filogenetskih dreves smo uporabili računalniški program TreeView (Page, 1996).

Izračun vrednosti theta (Φ) za binarne podatke z 99 permutacijskimi ponovitvami, ki je analogna vrednosti F_{st} za kodominantne podatke, smo izračunali v računalniškem programu GenAlEx 6.4.1 (Peakall in Smouse, 2006). Vrednost Φ predstavlja genetske povezave med genotipi znotraj populacije glede na skupno število populacij v analizi, opravljeni prek binarne distančne matrike, in se izračuna kot:

$$\Phi = \frac{V_{ap}}{V_{ap} + V_{wp}} \quad \dots(29)$$

V_{ap} je ocena variabilnosti med populacijami in V_{wp} ocena variabilnosti znotraj populacij.

Z uporabo računalniškega programa Structure 2.3.3 (Pritchard in sod., 2009) in vhodne matrike prisotnosti štirih alelov na posameznem lokusu smo z uporabo Bayesovega pristopa izvedli klastersko analizo za odkrivanje genetskih skupin znotraj analiziranih vzorcev v štiriletnem časovnem obdobju.

3.2.2.3 Vrednotenje inter- in intraspecijskih križanj ter prenosa genov

Analizo izvora oziroma genetske pripadnosti (Q-vrednost) naravnih populacij glede na možnost prenosa genov v naravi v štiriletnem časovnem obdobju smo vrednotili na podlagi kodominantne matrike, ki je vključevala štiri alele na posameznem lokusu v računalniškem programu Structure 2.3.3 (Pitchard in sod., 2009).

3.2.3 Primerjava prikaza in obdelave rezultatov med diploidnim in tetraploidnim nivojem

Ker računalniški program GenALEX 6.4.1 (Peakall in Smouse, 2006) ne omogoča obdelave kodominantnih podatkov ali binarnih zapisov za n -ploidne organizme, smo kot vhodno datoteko uporabili matriko binarnih zapisov štirih alelov na posameznem lokusu in jih v analizi obravnavali kot polimorfizme dolžin namnoženih fragmentov $2n$ -organizmov. Predvidevali smo namreč, da bodo rezultati te analize v veliki meri primerljivi z rezultati analize na podlagi alelnih dolžin na $2n$ -nivoju v istem računalniškem programu. Kodominantno matriko parnih genetskih primerjav, izdelano na podlagi podatkov o dolžinah alelov na $2n$ -nivoju, smo zato primerjali z binarno matriko parnih genetskih primerjav, izdelano na podlagi prisotnosti/odsotnosti 1–4 alelov na lokusu, kar smo nato primerjali z Mantelovim testom (Mantel, 1967). Na podlagi Mantelovega korelacijskega koeficienta (r_{xy}), ki je predstavljal merilo skladnosti obeh matrik enakih dimenzij (vključeni isti genotipi in populacije), smo ovrednotili povezanost dveh različnih pristopov obdelave dobljenih rezultatov. V primeru, da korelacijski koeficient presega vrednost 0,9, govorimo o zelo dobri povezanosti, če se nahaja v intervalu $0,8 < r_{xy} < 0,9$, govorimo o dobri povezanosti, če je v intervalu $0,7 < r_{xy} < 0,8$, govorimo o šibki povezanosti, in če je korelacijski koeficient nižji od 0,7, govorimo o zelo šibki povezanosti. Za orientacijo in primerjavo, kolikšen delež genetske informacije se lahko izgubi z različnimi pristopi, smo z Mantelovim testom primerjali kodominantno matriko alelnih dolžin in binarno matriko prisotnosti/odsotnosti vseh alelov na $2n$ -nivoju ter na podlagi r_{xy} -koeficienta skladnosti sklepali o njuni povezanosti na $2n$ -nivoju.

Pri ekonomsko pomembnih vrstah iz družine križnic, kot je vrsta *B. napus*, ki je s stališča naravnega nastanka (izvora) $4n$ -organizem, je pri analizah genetske raznolikosti ključnega pomena način, kako se rezultati obdelajo, saj se pristopi na tem področju razlikujejo. Poleg tega je pomembno tudi, kolikšen delež genetske informacije se pri tem izgubi, zato smo, tako da smo vključili v analizo binarne podatke na $4n$ -nivoju, želeli prikazati tudi, ali je bolj realno, da rezultate obravnavamo kodominantno na $2n$ -nivoju ali binarno na $4n$ -nivoju.

Primerjave rezultatov obdelav podatkov v računalniškem programu Structure 2.3.3 (Pitchard in sod., 2009) na podlagi alelnih dolžin na $2n$ - in na $4n$ -nivoju smo opravili na podlagi primerjav realnega števila klastrov, vrednosti alfa in vrednosti Q na tabličnih grafih med obema analizama.

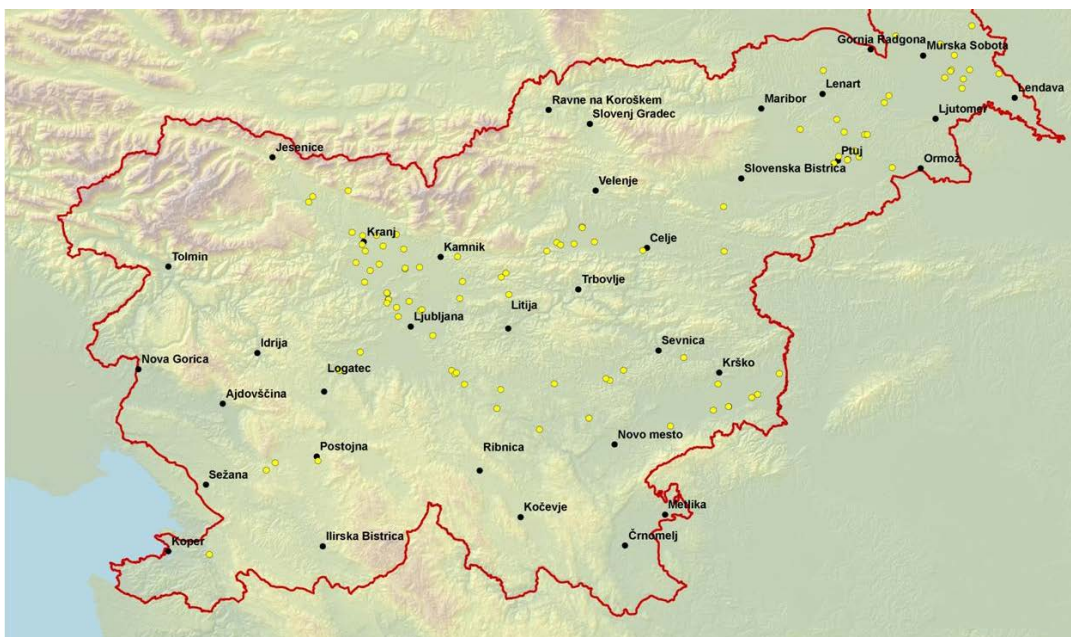
3.3 ANALIZA PRISOTNOSTI GENSKO SPREMENJENIH ORGANIZMOV VRSTE *B. napus* V SLOVENIJI

Z razvojem biotehnoloških metod so klasične metode žlahtnjenja dopolnile metode genskega inženiringa tudi pri vrsti *B. napus*, kar pomeni potencialno tveganje za vnos gensko spremenjenih organizmov v slovenski pridelovalni prostor. Ker je bil v Sloveniji Zakon o soobstoju gensko spremenjenih rastlin z ostalimi kmetijskimi rastlinami sprejet v letu 2009, smo pregled prisotnosti gensko spremenjene vrste *B. napus* omejili na samosevne in podivjane populacije iz let 2007 in 2008, vzorčenje ob koncu transportnih poti pa na leto 2008 (pridelek jesenske setve leta 2007), saj nikjer nismo pričakovali pozitivnih rezultatov.

3.3.1 Pridobivanje rastlinskega materiala

V analizo prisotnosti gensko spremenjenih organizmov smo vključili samosevne in podivjane populacije iz terenskega vzorčenja v letih 2007 in 2008 (listni material) ter seme (pridelek) oljne ogrščice iz leta 2008, ki smo ga pridobili na zaključku glavnih transportnih verig v Sloveniji. Vse analize za določitev gensko spremenjenih organizmov smo opravili v genetskem laboratoriju (del semenskega laboratorija) Kmetijskega inštituta Slovenije, ki je akreditiran s strani International Seed Testing Association (ISTA) ter deluje v skladu s standardoma ISO9001 in ISO17025. Ker so analize v naši doktorski disertaciji vključevale tudi delo z gensko spremenjenimi organizmi, smo se v vsem ravnali po predpisanih navodilih obeh standardov in standardnem operativnem postopku za delo z gensko spremenjenimi organizmi v zaprtem sistemu.

Terensko vzorčenje listnega materiala samosevnih in podivjanih populacij v letih 2007 in 2008 je potekalo po enaki metodi ter na istih lokacijah, kot je opisano v točki 3.1.1, kjer smo zbirali rastlinski material za analizo genetske raznolikosti. Lokacije vzorčenja listnega materiala so prikazane na sliki 10, saj niso zajete vse lokacije, ki so bile v obeh letih zajete v točki 3.1.1. Skupno je bilo v analizo prisotnosti gensko spremenjenih organizmov vključenih 89 lokacij, na katerih smo nabirali listni material.



Slika 10: Prikaz lokacij terenskega vzorčenja samosevnih in podivjanih populacij vrste *B. napus* v letih 2007 in 2008 za analizo prisotnosti gensko spremenjenih organizmov

Figure 10: Presentation of sampling locations from field survey of volunteer and feral populations of *B. napus* in 2007 and 2008 for detecting of GMO

Analiza prisotnosti gensko spremenjenih organizmov je vključevala tudi 69 vzorcev zrnja oljne ogrščice, ki je bilo pridelano v Sloveniji v letu 2008. Vzorce smo zajeli ob koncu transportnih verig, kjer so se zbirali vzorci večjih slovenskih pridelovalcev in organizatorjev pridelave, kot so Kmetijsko gospodarstvo Rakičan, d. d., Perutnina Ptuj, d. d., KŽK, kmetijstvo, d. o. o., in Skala, d. o. o. Znotraj teh podjetij smo od vsakega pridelovalca pridobili po 0,5 kg reprezentativnega vzorca oljne ogrščice, ki smo ga do nadaljnje analize shranili na 4 °C.

3.3.2 Referenčni material

Referenčni material za vse štiri genske elemente (bar, EPSPS, p35S in tNos), ki smo jih uporabili v presejalni analizi, smo pridobili v obliki semena (AOCS) in v obliki DNA (Qualitative GMO Reference Material Set, Fluka). Pridobili smo tudi seme oljne ogrščice, ki ni gensko spremenjena, in sicer kot negativno kontrolo za vse genske elemente (0 % oilseed rape, AOCS-0304A), ki je bila vključena pri pripravi vzorcev za mejo detekcije v PCR-analizi.

Kot referenčni material (pozitivno kontrolo) za genski element EPSPS in za pripravo DNA-vzorcev za mejo detekcije smo pridobili seme transgene linije oljne ogrščice RT/GT73 (100-odstotna, AOCS-0304B). Ta v svoji genski kaseti vsebuje EPSPS-gen, ki kodira 5-enolpiruvilšikimat-3-fosfat sintazo (EPSPS) iz CP4 *Agrobacterium* sp. (CP4 EPSPS) in pogojuje toleranco na glifosat. Po 10 semen AOCS-0304A (0-odstotna oljna ogrščica) in transgeno seme AOCS-0304B (100-odstotna oljna ogrščica RT/GT73) smo posejali v ločena lonca s šoto ter vzgojili mlade rastlinice. V fazi četrtega pravega lista smo pri vsakem od petih listov (vsak list iz ene rastline) vzeli približno enak košček

rastlinskega tkiva (približno 0,75 cm² površine lista) in jih združili v terilnici. Nadaljnji postopek izolacije DNA iz listnega tkiva je opisan v točki 3.3.3.

Priprava vzorcev za mejo detekcije gensko spremenjenih organizmov na kvalitativnem nivoju je potekala na osnovi kombinacije enakih masnih delov listnega tkiva vzgojenih rastlinic (faza četrtyh pravih listov), in sicer v razmerjih gensko spremenjena oljna ogrščica (100 %, AOCS-0304B) : gensko nespremenjena oljna ogrščica (0 %, AOCS-0304A) = 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20 in 1 : 50. Slednjo kombinacijo, ki detektira zelo nizko prisotnost gensko spremenjene oljne ogrščice v vzorcu, smo pripravili v 10 ponovitvah. Posamezne kombinacije listnih tkiv smo združili v terilnici. Nadaljnji postopek izolacije DNA iz listnega tkiva je opisan v točki 3.3.3. Pripravljeni vzorci so v analizi služili tudi kot referenčni material (pozitivne kontrole) za preverjanje endogenega gena, kruciferina, pri vrsti *B. napus* in kot negativne kontrole pri navzkrižnem preverjanju kontaminacije za naslednje genske elemente transgenih linij: bar, tNos in p35S.

Kot referenčni material (pozitivno kontrolo) za bar gen smo pridobili in uporabili DNA transgene linije 'Ms8xRf3' (Qualitative GMO Reference Material Set, Fluka). Bar gen je izoliran iz *Streptomyces hygroscopicus* in pogojuje toleranco na herbicid glufosinat amonij.

Kot referenčni material (pozitivno kontrolo) za 35S-promotor smo pridobili in uporabili DNA transgene linije oljnih ogrščic 'Oxy235' in 'Falcon GS40/90' (Qualitative GMO Reference Material Set, Fluka). 35S-promotor izvira iz virusa cvetačnega mozaika (CaMV).

Kot referenčni material (pozitivno kontrolo) za Nos-terminator smo pridobili in uporabili DNA transgene linije oljnih ogrščic 'Oxy235' in 'MS8xRF3' (Qualitative GMO Reference Material Set, Fluka). tNos predstavlja nekodirajoči del 3'-regije (3'-nos ali Nos-terminator) gena nopalina sintaze iz *Agrobacterium tumefaciens*.

3.3.3 Priprava vzorcev in izolacija celokupne DNA

Pri vsakem od petih listov posameznega vzorca s terena smo vzeli približno enak košček rastlinskega tkiva (približno 0,75 cm² površine lista) in jih združili v terilnici. Ob dodatku 2 ml CTAB-ekstrakcijskega pufra [2 % (w/v) CTAB, 1,4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 20 mM EDTA, 0,2 % (v/v) d-merkaptioetanol], ki je bil predhodno segret na 65 °C, smo vsebino strli v terilnici. Približno 1,5 ml homogeniziranega vzorca smo prenesli v 2-mililitrsko mikrocentrifugirko.

Priprava vzorcev iz semena je potekala tako, da smo iz posameznega vzorca semena (0,5 kg) natehtali 100 g semen in jih zmleli (M20, IKA-mlin). Izmed dobro premešanega zmlatega materiala smo od vsakega vzorca vzeli 25 mg moke in po štiri vzorce združili v 2-mililitrsko mikrocentrifugirko. Ker je bilo skupno 69 vzorcev, smo iz njih pripravili 17 združenih vzorcev (angl. bulkov) moke, tako da smo v zadnji združenih vzorec vključili 5 posameznih vzorcev po 20 mg moke. Vsak združenih vzorec smo pripravili v dveh ponovitvah. V vsako mikrocentrifugirko smo nato dodali 600 µl predhodno na 65 °C segretega CTAB-ekstrakcijskega pufra in dve jekleni kroglici. Nato smo za razkrojitev in

homogenizacijo vzorca mikrocentrifugirke položili v adapter za mikrocentrifugirke ter ga vstavili v razkrojevalec tkiv – TissueLyser (Retsch) za tri minute na maksimalno frekvenco (30 s^{-1}).

Izolacijo DNA iz listov in moke smo opravili po metodi CTAB, ki so jo opisali Kump in sod. (1992). Homogenizirane vzorce listnega in semenskega tkiva smo nato inkubirali 1,5 ure v vodni kopeli pri $65\text{ }^{\circ}\text{C}$, in to ob občasnem mešanju. Po inkubaciji smo vzorcem dodali 500 μl mešanice kloroform : izoamilalkohol v razmerju 24 : 1 in vse skupaj dobro premešali. Sledilo je petnajst minut centrifugiranja pri relativni centrifugalni sili 11.000 g. Nastali supernatant smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in DNA oborili z dodatkom 1/10 (v/v) 3 M Na-acetata (pH 5,2) in 1/1 (v/v) ledeno hladnega izopropanola. Vzorce smo premešali in za trideset minut postavili v zamrzovalnik ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Inkubaciji je sledilo centrifugiranje pri 11.000 g za petnajst minut. Nastali supernatant smo odstranili, usedlino na dnu mikrocentrifugirke, tj. DNA, sprali s 500 μl 70-odstotnega etanola in osušili pri sobni temperaturi. DNA smo raztopili v 80 μl TE-pufra in shranili pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.4 Merjenje koncentracije DNA

Koncentracijo DNA v izoliranih vzorcih smo izmerili po postopku, ki je opisan v točki 3.1.5.

Iz izolirane DNA iz listov, pobranih na terenu, smo nato pripravili 21 združenih vzorcev (bulkov), ki so vsebovali po 15 μl vsakega od štirih DNA-vzorcev s koncentracijo 20 ng/ μl , le zadnji združen vzorec je vključeval po 12 μl vsakega od petih DNA-vzorcev s koncentracijo 20 ng/ μl .

3.3.5 Kvalitativna PCR-analiza za določitev gensko spremenjenih organizmov vrste *B. napus*

Kvalitativno določitev prisotnosti endogenega gena, kruciferina, smo izvedli v vseh posameznih DNA-vzorcih s terena (89), v vseh združenih vzorcih (bulkih) semena oljne ogrščice (17, v dveh ponovitvah), v kontrolah in v slepih vzorcih. Pri pripravi reakcijske mešanice za PCR-analizo smo uporabili AmpliTaq kemikalije (Applied Biosystems). Presejalno analizo za štiri genske elemente (bar, EPSPS, p35S in tNOS) smo izvedli v vseh združenih vzorcih s terena (21), v vseh združenih vzorcih semena oljne ogrščice (17, v dveh ponovitvah), v referenčnih kontrolah z različnim deležem posamezne transgene linije (preglednica 5) ter pri slepih vzorcih. V analizo smo vključili tudi DNA iz listnega materiala 'RT/GT73', pripravljenega z razmerji gensko spremenjen : gensko nespremenjen = 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20 in 1 : 50 (v desetih ponovitvah) za mejo detekcije. Pri pripravi reakcijske mešanice za PCR-analizo smo uporabili AmpliTaq Gold kemikalije (Applied Biosystems). Reakcije namnoževanja endogenega gena in štirih presejalnih genskih elementov smo pripravili v končnem volumnu 25 μl in so vsebovale:

- 40 ng genomske DNA;
- 10X AmpliTaq/Gold PCR-pufer (Applied Biosystems);
- 10 mM koncentracijo vsakega deoksinukleotida trifosfata (Promega);
- 25 mM koncentracijo AmpliTaq/Gold MgCl_2 (Applied Biosystems);
- 10 μM koncentracijo vsakega začetnega oligonukleotida (Applied Biosystems);

- 0,5 enote AmpliTaq/Gold DNA-polimeraze (Applied Biosystems).

Pari začetnih oligonukleotidov, velikosti namnoženih fragmentov in referenčni material so opisani v preglednici 4, temperaturne nastavitve v kvalitativni PCR-analizi pa v prilogi A. PCR-analize smo opravili na cikličnem termostatu GeneAmp PCR System (Applied Biosystems). Prisotnost namnoženih produktov smo preverili na 2-odstotnem agaroznem gelu z dodatkom etidijevega bromida. V posamezen žepk agaroznega gela smo nanесли po 7 μ l PCR-produkta, zmešanega s 3 μ l pufru za potovanje fragmentov na gelski elektroforezi (pripravljen iz 6X DNA loading dye, Fermentas). Kot dolžinski marker smo uporabili GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas). Delo smo opravljali na sistemu za horizontalno elektroforezo (Agagel, Biometra). Potovanje fragmentov je potekalo pri električni napetosti 102 V in toku 22 mA ter je trajalo 45 minut. Vizualizacijo namnoženih fragmentov za endogeni gen in posamezen genski element (velikosti so opisane v preglednici 5) smo opravili pod UV-lučjo s sistemom za slikanje gelov (GenGenius, Syngene).

Preglednica 5: Pari začetnih oligonukleotidov, uporabljeni v kvalitativni PCR-analizi za določitev prisotnosti gensko spremenjenih organizmov

Velikost namnoženih fragmentov (D), reference objavljenih parov začetnih oligonukleotidov (Ref.) in referenčni material (Ref. mat.) v kvalitativni PCR-analizi.

Table 5: Primer pairs used in qualitative PCR analysis for GMO detection

Fragment lengths (D), references of the published primer pairs (Ref.) and reference material (Ref. mat.) used in qualitative PCR analysis.

Gen/genski element	Nukleotidno zaporedje parov začetnih oligonukleotidov v smeri 5'-3'	D [bp]	Ref.	Ref. mat.
Endogeni gen kruciferin	p cruMPF 1: TGGCTAAAGGTACGTGAATCTG p cruMPR 2: CTCTCCCCATAAGACCTTCTCC	258	James in sod. (2003)	0 % RT/GT73
EPSPS	p 4EPSPS-1: CAACGCAAATCTCCCTTATCGG p 4EPSPS-2: GACCTCCAAACATGAAGGACCT	274	Demeke in sod. (2002)	0 %, 0,5 %, 2 %, 100 % 'RT/GT73'
p35S	p 35S-1: GCTCCTACAAATGCCATCA p 35S-2: GATAGTGGGATTGTGCGTCA	195	Lipp in sod. (2001)	0 %, 2 %, 100 % 'Oxy235' in 'Falcon GS40/90'
tNos	Nos-1: GAATCCTGTTGCCGGTCTTG Nos-2: TTATCCTAGTTTGCGCGCTA	180	Ehler in sod. (1997)	0 %, 100 % 'Oxy235' in 'MS8xRF3'
bar	Bar CRAw-1: ACGAGCCAGGGATAGCGC Bar CRAw-2: TCTGCACCATCGTCAACCAC	121	Hanna (2007)	0 %, 2 %, 5 %, 100 % 'MS8xRF3'

3.3.6 Določitev gensko spremenjenih organizmov vrste *B. napus* z uporabo Q-PCR-analize

Za dodatno informacijo o prisotnosti gensko spremenjene vrste *B. napus* ter določitvi transgenih samosevnih in podivjanih populacij vrste *B. napus* smo preizkusili tudi metodo določitve z uporabo PCR-ja v realnem času (angl. Real Time PCR ali Q-PCR). Ta tehnika omogoča poleg določitve gensko spremenjenih organizmov tudi kvantifikacijo v primeru pozitivnih rezultatov kvalitativne presejalne analize. Ne glede na rezultate kvalitativne PCR-določitve smo opravili analizo za vse štiri genske elemente (bar, EPSPS, p35S in

tNos) iz točke 3.3.5, le da smo v analizo vključili le združene vzorce DNA iz listov s terena, torej samosevne in podivjane populacije vrste *B. napus*.

Za določanje gensko spremenjenih organizmov smo uporabili validirane metode, ki jih uporabljamo v ISTA-akreditiranem semenskem laboratoriju. Q-PCR-analizo smo izvajali na aparaturi Real Time PCR 7500 (Applied Biosystems), za nanos vzorcev smo uporabljali optične 96-mestne plošče (Applied Biosystems), kjer je bil vsak združen vzorec s terena (21, od A do V) analiziran v dveh ponovitvah za vsak posamezen genski element, vključno z referenčnimi kontrolami, slepimi vzorci (NTC) in vzorci za mejo detekcije (0,01). Za določanje gensko spremenjenih organizmov vrste *B. napus* smo vključili vrstnospecifični referenčni sistem z uporabo *FatA*-endogenega gena v vseh vzorcih za vse genske elemente.

Začetni oligonukleotidi, fluorescentne sonde in referenčne kontrole za endogeni gen ter vsak posamezen transgeni element v Q-PCR-analizi so predstavljeni v spodnji preglednici (preglednica 6).

Preglednica 6: Pari začetnih oligonukleotidov, uporabljeni v Q-PCR-analizi za določitev prisotnosti gensko spremenjenih organizmov

Nukleotidno zaporedje fluorescentnih sond, velikost namnoženih fragmentov (D), reference objavljenih parov začetnih oligonukleotidov in sond (Ref.) ter referenčni material (Ref. mat.).

Table 6: Primer pairs used in Q-PCR analysis for GMO detection

Probes, fragment lengths (D), references of the published primer pairs and probes (Ref.) and reference material (Ref. mat.).

Gen/gens- ki element	Nukleotidno zaporedje parov začetnih oligonukleotidov v smeri 5'-3'	Fluorescentna sonda (5'-FAM-...- TAMRA-3')	D (bp)	Ref.	Ref. mat.
Endogeni gen <i>FatA</i>	1: ggtctctcagcaagtgggtgat 2: tcgtcccgaactcatctgtaa	atgaaccaagacacaagg cggcttca	76	A recomended..., 2004	'RT/GT73'
EPSPS	1:ccatattgaccatcatactcattgct 2:gcttatacgaaggcaagaaaagga	ttcccgacatgaagatca tcctcctt	108	A recomended..., 2004	'RT/GT73'
p35S	1:attgatgtgatatctccactgacgt 2:cctctccaaatgaaatgaacttct	cccactatccttcgcaaga cccttct	101	Kuribara in sod., 2002	'Oxy235' in 'Falcon GS40/90'
tNos	1:gtcttgcgatgattatcatataatttct g 2:cgctatatattgtttctatcgctg	agatgggtttttatgattag agtcccgcaa	151	Kuribara in sod., 2002	'Oxy235' in 'MS8xRF3'
bar	1:acgagccaggatagcgc 2:tctgcaccatcgtaaccac	cccgcagacggacgagg tcg	121	Hanna, 2007	'MS8xRF3'

PCR-reakcijska mešanica (za specifični transgeni element in za endogeni gen *FatA*) v končnem volumnu 20 µl je vsebovala: TaqMan Universal PCR Master mix (Applied Biosystems), 10 µM koncentracijo vsakega od začetnih oligonukleotidov (Applied Biosystems), 10 µM koncentracijo fluorescentne sonde (Applied Biosystems) in 40 ng genomske DNA. Sledila je Q-PCR-analiza z naslednjimi temperaturnimi nastavitvami: 50 °C za dve minuti, nato 95 °C za deset minut, sledi 42 ciklov pri 95 °C za petnajst sekund in pri 60 °C za eno minuto, kar se zaključí z zapisovanjem rezultatov opravljene analize. Namnoženi PCR-produkti se detektirajo v vsakem posameznem ciklu (realni čas) analize prek tarčnospecifične fluorescentne sonde, ki je označena z značkama FAM (deluje kot "reporter") in TAMRA (deluje kot "quenchher"). Aktivnost DNA-polimeraze, ki se

specifično veže in razreže nukleotidno zaporedje sonde na točno določenem mestu, pa se odraža z naraščajočo fluorescenco omenjenih fluorescentnih značk. To dogajanje aparatura zazna kot signal, ko v določenem ciklu ta preseže nastavljeno mejno vrednost. Ta mejna vrednost se imenuje Ct- vrednost (angl. threshold Cycle).

Po končani Q-PCR-analizi smo rezultate analizirali v SDS-programu (7500 Real Time PCR System Sequence Detection Software 1.3), kjer smo na podlagi razlike med fluorescentnim signalom vseh komponent v analizi (R_n^+) in osnovnim signalom reakcije (R_n^-) pridobili vrednost ΔR_n za določitev Ct-vrednosti posameznega vzorca.

4 REZULTATI

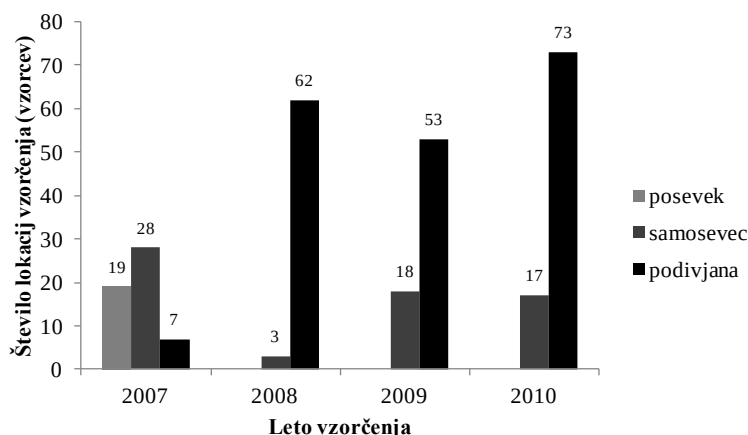
4.1 ANALIZA GENETSKE RAZNOLIKOSTI NA DIPLOIDNEM NIVOJU

4.1.1 Genotipi, vključeni v analizo genetske raznolikosti

Skupno je bilo v analizo genetske raznolikosti vključenih 498 različnih genotipov. Od tega smo jih 468 analizirali s pomočjo 45 različnih markerjev, 30 pa s pomočjo 15 različnih markerjev.

4.1.1.1 Genotipi vrste *B. napus*

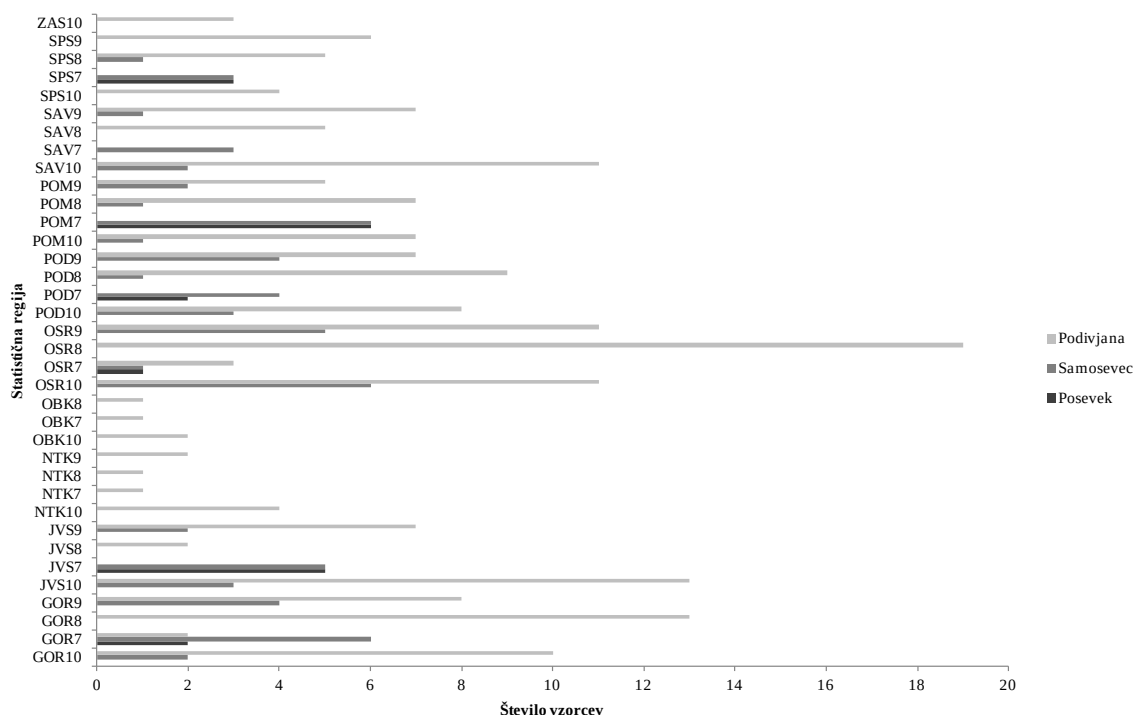
V obdobju 2007–2010 smo rastline vrste *B. napus* vzorčili na 280 lokacijah. Razporeditev lokacij vzorčenja po posameznih letih glede na pojavno obliko vrste *B. napus* je prikazana na sliki 11. Vzorčene lokacije za posamezno leto so predstavljene v prilogah B, C, D, in E.



Slika 11: Število pobranih vzorcev rastlin vrste *B. napus* na terenu v štiriletnem časovnem obdobju glede na njihovo pojavno obliko

Figure 11: Number of collected samples of *B. napus* from field survey in four-year period according its appeared form

Ker je območje Slovenije razdeljeno na 12 statističnih regij, smo to upoštevali tudi v doktorski disertaciji. V štiriletnem časovnem obdobju smo vzorce na terenu zbrali znotraj gorenjske (GOR), notranjsko-kraške (NTK), obalno-kraške (OBK), osrednjeslovenske (OSR), podravske (POD), pomurske (POM), savinjske (SAV), spodnjeposavske (SPS) in zasavske regije (ZAS) ter regije jugovzhodna Slovenija (JVS), medtem ko v tem obdobju znotraj goriške in koroške regije nismo našli nobenega vzorca, zaradi česar v analizah ti dve regiji nista zastopani. Zastopanost posameznih lokacij vzorčenja v posamezni statistični slovenski regiji v posameznem letu je glede na pojavno obliko populacij vrste *B. napus* prikazana na sliki 12.



Slika 12: Obseg lokacij vzorčenja posevkov, samosevnih in podivjanih populacij vrste *B. napus* v posameznih letih glede na statistične regije v Sloveniji

Številka ob oznaki regije določa leto vzorčenja, pri čemer so: 7 – 2007, 8 – 2008, 9 – 2009 in 10 – 2010.

Figure 12: Extension of sampled locations of cultivated, volunteer and feral populations of *B. napus* in each year according to statistical regions of Slovenia

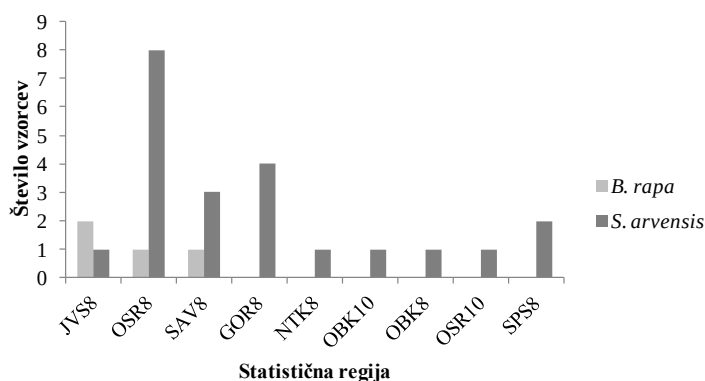
Number beside of region label defines the year of field sampling, where 7 represents 2007, 8-2008, 9-2009 and 10-2010.

V doktorski disertaciji je bilo skupno identificiranih sedem lokacij, na katerih je vzorčenje predstavnikov vrste *B. napus* v štiriletnem časovnem obdobju potekalo več kot enkrat. Te lokacije so predstavljene v prilogi F.

Skupno smo zbrali tudi 58 različnih referenčnih sort vrste *B. napus*, ki so se na območju Slovenije pridelovale od leta 1984. V analizo genetske raznolikosti smo vključili po tri različne združene vzorce vsake sorte, obe kolerabi ('Hofmanova rumena' in 'Rumena maslena') sta bili vključeni s po enim vzorcem, tako da je bilo skupno analiziranih 170 referenčnih genotipov vrste *B. napus* (točka 3.1.2, preglednica 2).

4.1.1.2 Genotipi spolno kompatibilnih sorodnikov

V sklopu terenskega vzorčenja v času cvetenja vrste *B. napus* v obdobju 2007–2010 smo skupno vzorčili na 26 lokacijah, kjer so se le v letih 2008 in 2010 nahajali SKS-ji vrste *B. napus*. Od tega so se na 4 lokacijah nahajale populacije vrste *B. rapa*, na 22 lokacijah pa populacije vrste *S. arvensis*. Vzorce lokacije SKS-jev vrste *B. napus* so predstavljene v prilogi G. Regijska zastopanost vzorčenih lokacij je prikazana na sliki 13.



Slika 13: Obseg lokacij vzorčenja SKS-jev vrste *B. napus* v posameznih letih glede na statistične regije v Sloveniji

Številka ob oznaki regije določa leto vzorčenja, pri čemer sta: 8 – 2008 in 10 – 2010.

Figure 13: Extension of sampled locations of SKR of *B. napus* in each year according to statistical regions of Slovenia

Number beside of region label defines the year of field sampling, where 8 represents 2008 and 10-2010.

V sklopu zbiranja referenčnih sort SKS-jev smo v analizo genetske raznolikosti vključili 22 tistih sort, ki se pojavljajo v Sloveniji in imajo največjo sposobnost križanja s predstavniki vrste *B. napus*. Ti referenčni genotipi zato pripadajo različnim rodovom in vrstam znotraj družine Brassicaceae. Predstavljeni so v točki 3.12 (preglednica 3).

4.1.2 Genetska povezanost pridelovalnih (referenčnih) genotipov vrste *B. napus* v Sloveniji

Ustreznost uporabe in informativnost mikrosatelitnih markerjev smo vrednotili na podlagi parametrov variabilnosti, opisanih za posamezen lokus v preglednici 7. Predstavljene vrednosti so bile izračunane na podlagi genotipizacije na 45 lokusih in z 162 referenčnimi genotipi, ki so vključevali 54 različnih sort vrste *B. napus* – vsaka sorta je bila obravnavana na podlagi treh genotipov. Povprečna genetska raznolikost (H_e) na vseh obravnavanih lokusih je 0,654 in hkrati predstavlja tudi delež populacije, ki bi bila heterozigotna v primeru, če bi med posamezniki prišlo do naključnega križanja, ter s tem zmožnost izbranega seta mikrosatelitnih markerjev za ločevanje med izbranimi genotipi v analizi. Povprečen delež heterozigotnih genotipov (H_o) v analizi je 0,690 in je višji od pričakovanega (H_e), kar nakazuje na populacijsko dinamiko posameznih sort pri analizi odstopanj od Hardy-Weinbergovega ravnotežja (HWE), kjer smo ugotovili, da nobeno odstopanje nobenega genotipa znotraj sorte na nobenem analiziranem lokusu ni statistično značilno ($p < 0,05$), kar pomeni, da so vse analizirane populacije (sorte) znotraj vrednosti HWE – v ravnotežju. Poleg tega se odstopanje pričakovane heterozigotnosti od obravnavane heterozigotnosti odraža tudi v povprečni vrednosti frekvenc ničtih alelov, ki je v naši analizi negativna ($N_o = -0,230$), kar pomeni, da v obrobni regiji izbranih mikrosatelitnih lokusov ni bilo zaznati mutacij, zaradi česar bi lahko prišlo do neprepoznavanja mest prileganja začetnih oligonukleotidov. Skupno smo v analizi določili 572 alelov, v povprečju 12,7 alela na lokus. Največjo stopnjo polimorfizma znotraj referenčnih genotipov vrste *B. napus* smo zabeležili na lokusu Na12-C06 (26 alelov), ki izvira iz vrste *B. napus*, najmanj pa na lokusu Ni4-G04 (4 alele), ki izvira iz vrste *B. nigra*. Kot najbolj informativen se je za analizo genetske raznolikosti znotraj vrste *B. napus* izkazal mikrosatelitni marker Ol11-D12 ($PIC = 0,881$), ki vsebuje enostaven dinukleotidni

ponavljajoči se motiv (GA/CT)₅₂, kot najmanj informativen pa lokus BN83B1 (PIC = 0,152), ki predstavlja sestavljeno di- in trinukleotidno ponavljajoče se zaporedje (GA)₁₁(AAG)₄. Povprečna informativnost izbranega seta 45 mikrosatelitnih markerjev je bila visoka (0,618), glede na to, da smo opravljali analizo genetske raznolikosti znotraj vrste. Skupno verjetnost enakosti genotipov (zmnožek vrednosti vseh lokusov), ki posledično predstavlja tudi mero informativnosti mikrosatelitnih markerjev, je bila zelo nizka, $1,54 \times 10^{-40}$, kar odraža visoko informativnost in hkrati enakomerno razporejenost alelov med genotipi znotraj sort ter med njimi. Povprečni delež polimorfnihi lokusov v analizi je dosegel vrednost 83,95 %.

Preglednica 7: Parametri variabilnosti po posameznih lokusih

Izraženi s številom alelov (N), razponom dolžin alelov (Ra), pričakovano heterozigotnostjo (He), dejansko heterozigotnostjo (Ho), frekvenco ničtih alelov (No), verjetnostjo enakosti genotipov (PI) za genotipe in informacijsko vrednostjo polimorfizma (PIC).

Table 7: The parameters of variability for each locus including number of alleles (N), range of allele lengths (Ra), expected heterozygosity (He), observed heterozygosity (Ho), frequency of null alleles (No), probability of identity (PI) and polymorphic information content (PIC).

Ime lokusa	N	Ra (bp)	He	Ho	No	PI	PIC
Na12-A07	10	162-186	0,583	0,648	-0,042	0,206	0,551
Na12-B05	13	135-209	0,815	0,888	-0,042	0,060	0,787
Na12-C08	21	275-349	0,821	0,616	0,111	0,045	0,806
Na12-E05	19	102-176	0,778	0,969	-0,109	0,071	0,755
Na12-G05	18	150-254	0,859	0,839	0,009	0,035	0,841
Na14-E11	8	108-144	0,648	0,975	-0,200	0,189	0,582
Na14-G02	12	139-213	0,659	0,636	0,013	0,162	0,613
Ni3-G04b	9	103-171	0,527	0,840	-0,206	0,322	0,428
Ni4-D09	14	172-222	0,782	0,975	-0,110	0,071	0,757
Ni4-E08	11	105-195	0,159	0,136	0,019	0,710	0,157
Na12-A08	13	167-205	0,752	0,665	0,048	0,097	0,716
Na12-E06a	8	168-192	0,750	0,844	-0,055	0,100	0,711
Na12-C06	26	153-297	0,902	0,877	0,012	0,018	0,810
Na10-A08	22	107-221	0,873	0,840	0,016	0,027	0,859
Na14-H11	15	102-170	0,814	0,969	-0,087	0,053	0,793
BN83B1	10	135-232	0,154	0,124	0,025	0,716	0,152
MR183	10	76-108	0,700	0,988	-0,171	0,142	0,646
Ni4-G04	4	270-344	0,589	0,632	-0,028	0,235	0,522
Ni4-H04	13	134-234	0,776	0,394	0,214	0,077	0,747
Ol10-D03	11	106-198	0,682	0,981	-0,179	0,151	0,631
Ol11-D12	24	111-203	0,893	0,610	0,148	0,021	0,881
Ol11-G11	13	99-185	0,757	0,975	-0,126	0,091	0,724
Ol11-H02	12	140-218	0,800	0,741	0,031	0,068	0,770
Ol12-A04	8	130-202	0,485	0,556	-0,049	0,289	0,461
Ol12-B05	9	148-206	0,152	0,124	0,024	0,725	0,146
Ol12-D05	10	101-193	0,734	0,747	-0,009	0,115	0,688
Ol12-D09	9	103-154	0,593	0,988	-0,249	0,252	0,506
Ol12-E03	8	97-136	0,776	0,969	-0,110	0,084	0,741
Ol12-F11	12	134-248	0,715	0,882	-0,098	0,118	0,677
Ol13-E08	14	126-266	0,594	0,758	-0,103	0,235	0,523
Ra2-A01	11	98-178	0,608	0,975	-0,229	0,232	0,528
Ra2-A10	8	176-286	0,849	0,046	0,431	0,045	0,821
Ra2-E03	14	227-313	0,616	0,333	0,174	0,190	0,573
Ra2-E04	15	96-218	0,710	0,932	-0,131	0,132	0,661
Ra2-E12	16	121-257	0,763	0,765	-0,003	0,084	0,733

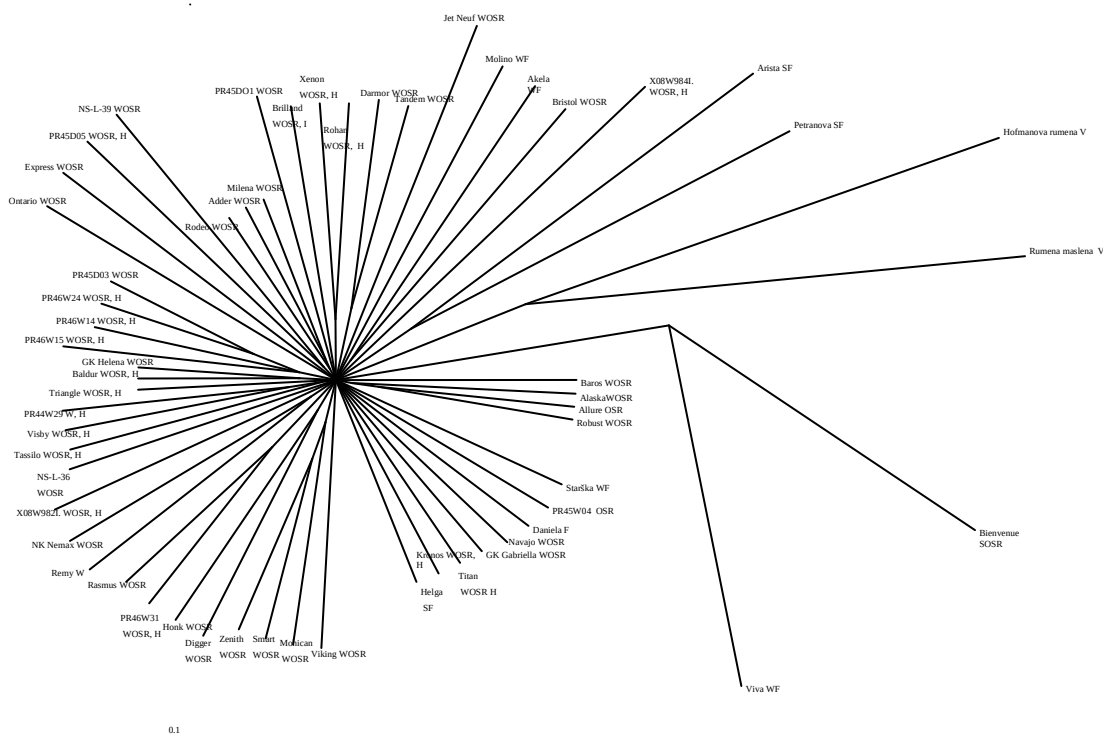
Se nadaljuje.

Nadaljevanje.

Ime lokusa	N	Ra (bp)	He	Ho	No	PI	PIC
Ra2-F11	19	151-271	0,738	0,926	-0,109	0,107	0,698
Ra2-G09	14	168-294	0,529	0,253	0,179	0,241	0,510
Ra3-E05	13	183-285	0,646	0,728	-0,051	0,185	0,586
Ra3-H10	9	136-202	0,631	0,833	-0,125	0,177	0,590
BRMS-036	12	96-178	0,756	0,982	-0,129	0,098	0,716
BRMS-050	12	143-193	0,372	0,327	0,031	0,420	0,346
MR187	14	101-189	0,473	0,352	0,081	0,291	0,460
RES1	14	104-199	0,839	0,926	-0,048	0,046	0,817
RES6	7	163-223	0,198	0,105	0,077	0,648	0,194
BN6A2	8	93-129	0,569	0,383	0,117	0,238	0,516
Skupaj	572					1,54x10 ⁻⁴⁰	
Povprečje	12,7		0,654	0,690	-0,230		0,618

Ko pa smo v analizo vključili še dodatne genotipe sort (staro oljno 'Bienvenue' in staro krmno sorto 'Viva') vrste *B. napus* subsp. *napus* in obe sorti podzemne kolerabe – *B. napus* subsp. *napobrassica* ('Hofmanova rumena' in 'Rumena maslena'), ki smo jih genotipizirali na 15 lokusih, se vrednosti, ki so zapisane v zgornji preglednici, niso značilno spremenile, razen pri frekvencah ničtih alelov, ki jih v tem primeru ni relevantno ocenjevati. Ugotovili smo le, da je bilo na vsakem izmed 15 lokusov najdenih 1–2 alela več, razen na lokusu Ol12-D05, kjer se število alelov ni spremenilo. Na lokusih Ni4-H04 in Ra3-H10 pa se je število alelov povečalo za štiri, kar pomeni, da lahko na teh dveh lokusih ločimo genotipe na nivoju obeh podvrst (subsp. *napus* in *napobrassica*). Poleg tega se je znižala skupna vrednost enakosti genotipov, ki je v tej analizi znašala $PI = 5,9 \times 10^{-43}$ in kaže na učinkovit izbor mikrosatelitnih markerjev za analizo genetske raznolikosti znotraj vseh obravnavanih sort vrste *B. napus*, tako krmnih kot oljnih linij ter hibridov in podzemnih kolerab, v slovenskem pridelovalnem prostoru.

Genetske povezave na osnovi razdalje skupnih alelov (angl. shared allele distance – DAS) (Chakraborty in Jin, 1993) in algoritma najbližjih sosedov (NJ) (Sautoi in Nei, 1987) med posameznimi genotipi znotraj referenčnih sort ter med njimi so predstavljene na sliki 15. Radialno drevo, izrisano na sliki 14, pa prikazuje genetsko raznolikost referenčnih sort genskega sklada vrste *B. napus* v Sloveniji v obdobju 1984–2010 na podlagi standardne genetske razdalje (Ds) (Nei, 1987) in UPGMA-algoritma združevanja. Obe filogenetski drevesi generalno razvrščata genotipe znotraj referenčnih sort in sorte v štiri glavne skupine, kar sovпада z rezultati Bayesove klastrske analize na osnovi *ad hoc* statistike, v kateri smo določili štiri skupine. Eno izmed skupin sestavljajo izključno predstavniki ozimne krmne in ozimne oljne ogrščice (W, WOSR), izmed katerih je kar 10 od skupno 16 hibridnih sort. Naslednja je manjša skupina, ki vključuje le štiri predstavnike oljne ogrščice in ozimne oljne ogrščice (OSR, WOSR). Med že omenjenima skupinama se nahajajo sorte, ki so po namenu pridelave precej različne. Vključujejo tri »stare« krmne sorte (SF, F, WF), ki se na območju Slovenije pridelujejo najdlje, ter sorto oljne ogrščice (OSR) in ozimne sorte oljne ogrščice (WOSR), od tega dva hibrida. Četrta skupina, ki je najbolj obsežna ter po namenu pridelave in načinu uporabe sort tudi najbolj raznolika, po večini vključuje ozimne sorte oljne ogrščice (WOSR), jaro oljno ogrščico (SOSR) ter tudi jare in ozimne krmne sorte. Izmed vseh so v četrti skupini štiri hibridne sorte in ena inbridirana linija. V to skupino spadata tudi obe sorti podzemne kolerabe (V) (slika 14).



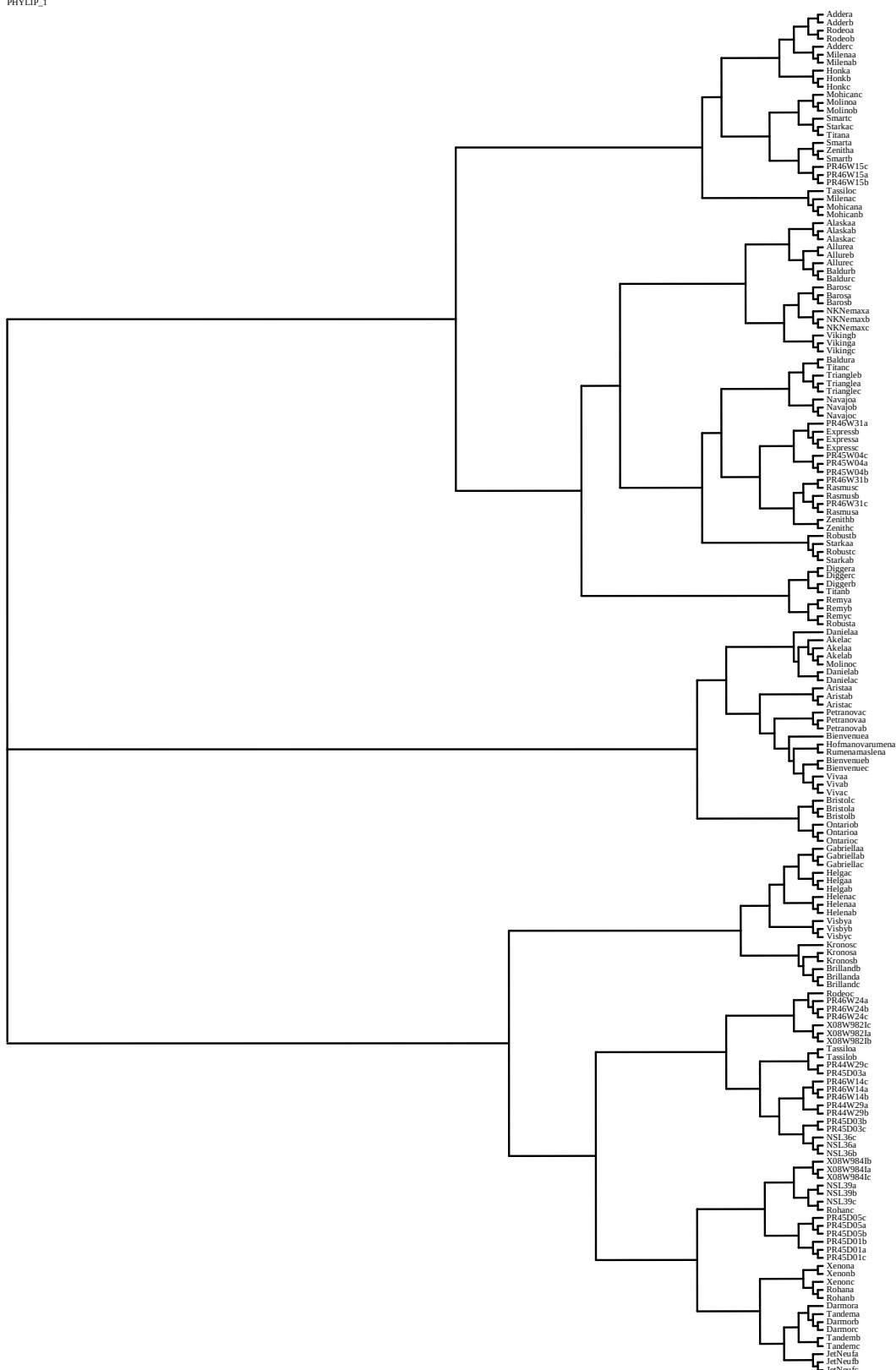
Slika 14: Radialno drevo referenčnih sort vrste *B. napus*, izdelano na podlagi Ds- in UPGMA-metode združevanja, ki vključuje obliko gojenja in tip uporabe
V – zelenjadna oblika, W – ozimna oblika, S – jara oblika, OSR – oljna ogrščica, F – krmna ogrščica in H – hibrid ali I – inbridirana linija.

Figure 14: Radial tree of reference varieties of *B. napus* based on Ds and UPGMA clustering method including growth status and usage type

V -vegetable form, W-winter form, S-spring form, OSR-oilseed rape, F-fodder rape and H-hybrid or I- inbred line.

Analiza genetskih povezav med genotipi znotraj sorte na podlagi DAS- in NJ-algoritma je pokazala, da je referenčnih sort, znotraj katerih so si posamezni genotipi zelo blizu, 36; znotraj devetih sort je izenačenost nekoliko manjša, najmanjšo izenačenost znotraj sorte pa smo pokazali pri sortah 'Rodeo', 'Milena', 'Zenith', 'Starška', 'Robust' in 'Daniela' ter pri treh hibridnih sortah 'Baldur', 'Tassilo' in 'Titan' (slika 15). Izenačenosti znotraj obeh sort podzemne kolerabe nismo izračunali, saj je bila vsaka v analizo vključena z enim genotipom. Visoko stopnjo izenačenosti znotraj referenčnih sort vrste *B. napus* subsp. *napus* smo izračunali tudi v analizi AMOVA na podlagi F- in R-statistike, ki sta pokazali visoko stopnjo variabilnosti med posameznimi referenčnimi sortami. Skupni delež molekulske variance med genotipi znotraj sort, izračunan na podlagi R-statistike prek alelna distančne matrike, je znašal 7 %, delež molekulske variance med posameznimi sortami 83 %, ostalih 10 % molekulske variance pa je posledica variabilnosti znotraj genotipov. Izračuni molekulske variance na podlagi F-statistike kažejo, da molekulske variance med genotipi znotraj referenčnih sort *B. napus* ni, med posameznimi sortami znaša 19 %, največja pa je znotraj genotipov in znaša 81 %.

PHYLIP_1



Slika 15: Genetske povezave med posameznimi genotipi znotraj referenčnih sort vrste *B. napus* in med njimi, predstavljene na osnovi DAS-matrike in NJ-metode združevanja
Oznake a, b in c ob vsakem imenu sorte označujejo posamezen genotip znotraj sorte.

Figure 15: Genetic relationship between different genotypes inside reference varieties of *B. napus* and among them, based on DAS matrix and NJ clustering method
Labels a, b and c beside of each variety name represents different genotype inside variety.

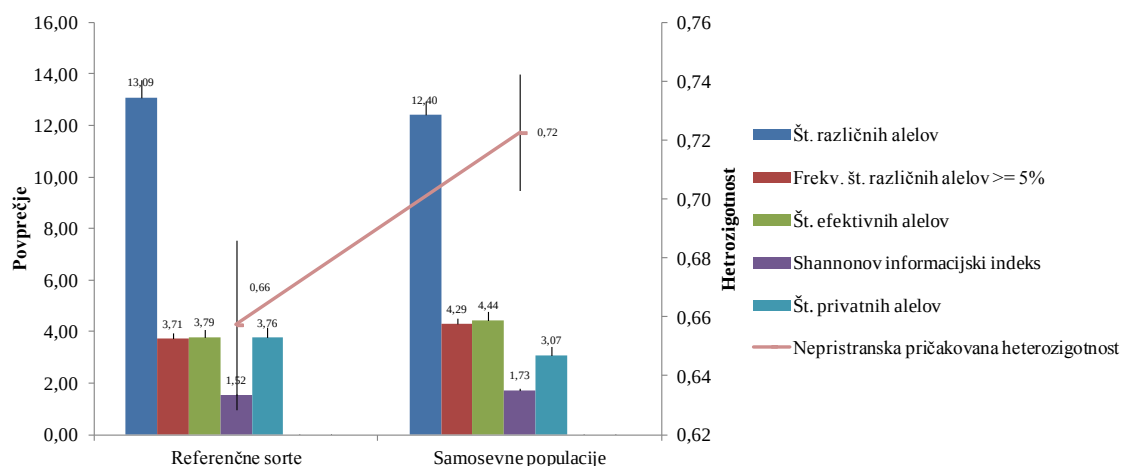
4.1.3 Genetska struktura samosevnih populacij vrste *B. napus* v Sloveniji

V analizo genetske strukture samosevnih rastlin vrste *B. napus* smo vključili vse genotipe samosevnih populacij, ki smo jih na območju celotne Slovenije zbrali v štiriletnem časovnem obdobju. Njihove genetske profile smo primerjali z genetskimi profili referenčnih genotipov vrste *B. napus* subsp. *napus* s pomočjo 45 markerjev (sorti 'Viva' in 'Bienvenue' sta iz tega dela izključeni) in tudi z referenčnimi genotipi vrste *B. napus* subsp. *napobrassica* ter SKS-je v slovenskem pridelovalnem prostoru s pomočjo 15 markerjev.

4.1.3.1 Genetska primerjava samosevnih populacij z referenčnimi genotipi sort vrste *B. napus* subsp. *napus* z uporabo petinštiridesetih markerjev

Genetska raznolikost (H_e) samosevnih populacij na vseh 45 lokusih znaša 0,723 in hkrati predstavlja tudi visoko zmožnost ločevanja izbranega seta mikrosatelitnih markerjev. Delež heterozigotnih genotipov v vseh samosevnih populacijah je 0,671 in je nižji od pričakovanega (0,723), kar dopušča možnost prisotnosti homozigotnih ničtih alelov na analiziranih lokusih. Povprečna stopnja, pri kateri z izbranimi mikrosatelitnimi markerji nedvoumno določimo genetsko identiteto posameznega genotipa v samosevnih populacijah, znaša 0,690.

Spremembe v alelni strukturi samosevnih populacij so v primerjavi z referenčnimi sortami predstavljene na sliki 16. Odstopanja vseh proučevanih parametrov med obema skupinama analiziranih vzorcev pojasnjujejo, da so genetsko zelo podobni genotipi vključeni tako v eno kot tudi v drugo skupino. Poleg tega pa je na podlagi višje vrednosti frekvence števila različnih alelov in števila efektivnih alelov pri samosevnih populacijah mogoče sklepati na vnos tujih alelov (lahko iz njihovih SKS-jev) prek spontanega oprašitev takrat, ko so bile rastline v času cvetenja izpostavljene prenosu peloda in se je tako oprášeno seme ohranilo v tleh do naslednjega leta. Poleg tega smo pri teh populacijah izračunali tudi višjo pričakovano heterozigotnost (0,72) in vrednost Shannonovega informacijskega indeksa (1,73), kar kaže na višjo alelno in genetsko raznolikost samosevnih populacij v primerjavi z referenčnimi sortami (1,52). Fiksacijski indeks referenčnih sort vrste *B. napus* je zato tudi negativen ($F = -0,038$) in odraža presežek heterozigotnih genotipov ter usmerjeno selekcijo pri žlahtnjenju, medtem ko je pri samosevnih populacijah F -vrednost pozitivna (0,072) in pojasnjuje možnost spontanega oprašitev med genotipi v naravi. Izračunana stopnja tujeprašnosti (t) znotraj referenčnih sort znaša 1,08, znotraj samosevnih populacij 0,87, povprečna skupna pa 0,97.



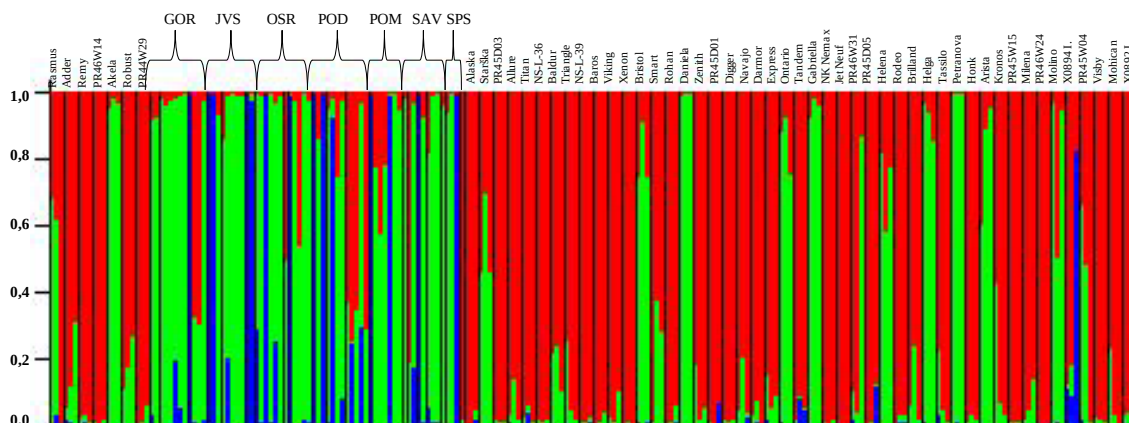
Slika 16: Primerjava alelnih vzorcev v genetski strukturi med referenčnimi sortami in samosevnimi populacijami vrste *B. napus* subsp. *napus*

Figure 16: Comparison of allelic patterns in genetic structure between reference varieties and volunteer populations of *B. napus* ssp. *napus*

Odstopanje vseh genotipov znotraj samosevnih populacij od vrednosti HWE je bilo na vseh 45 lokusih statistično značilno; na lokusu Ni4-D09 z verjetnostjo $p = 0,05$, na lokusih Ol12-D05 in MR187 z verjetnostjo $p = 0,01$, na ostalih lokusih pa z verjetnostjo $p = 0,001$. Na lokusu Ol12A04 smo izračunali daleč najvišjo vrednost števila genetskih migrantov oziroma najvišjo oceno stopnje prenosa genov ($N_m = 140,6$), sledita lokusa Na12-E05 ($N_m = 88,1$) in Ol11-H02 ($N_m = 87,2$). Najnižjo vrednost števila migrantov smo določili na lokusu Ni4-E08 ($N_m = 4,1$). Vse vrednosti so podane na podlagi 100-odstotnega deleža polimorfnihi lokusov. Sicer pa je povprečna stopnja prenosa genov (m) med referenčnimi sortami in samosevnimi populacijami neodvisno od velikosti populacij na podlagi Barton-Slatkinove ocene znašala 2,209 in povprečna frekvenca privatnih alelov 0,168.

Rezultati PCoA-analize so pokazali, da prve tri koordinate skupno pojasnijo 63 % variabilnosti – prva koordinata 29, 3 %, druga 17, 4 %, tretja pa 16,3 %. Na podlagi rezultatov analize AMOVA smo izračunali 11,4-odstotni delež molekulske variabilnosti med populacijami, negativni –7,7-odstotni delež med genotipi znotraj populacij in 96,3-odstotni delež znotraj genotipov.

Genetska struktura genotipov samosevnih populacij po posameznih regijah vzorčenja v Sloveniji in struktura genotipov referenčnih sort na podlagi ocene aposteriorne verjetnosti, da genotip pripada posamezni genetski skupini – klastru v Bayesovi klasterski analizi, je prikazana na sliki 17. Povprečna genetska razdalja med posameznimi genotipi je najmanjša znotraj prve genetske skupine (modra) in znaša 0,64, kjer je zato tudi genetska raznolikost najvišja ($F_{st} = 0,14$). Genetska razdalja znotraj druge genetske skupine (zelena) znaša 0,68, kjer je vrednost F_{st} enaka 0,11. Najmanjša genetska raznolikost med posameznimi genotipi se kaže v tretji genetski skupini (rdeča), kjer znaša povprečna genetska razdalja med genotipi 0,83 in je zato tudi genetska različnost blizu 0 ($F_{st} = 0,07$), kar pomeni, da so genotipi znotraj te skupine blizu HW-ravnotežja. Iz slike 17 je razviden tudi izvor samosevnih rastlin glede na referenčne genotipe in njihova genetska struktura, ki vključuje spontana križanja v letu, ko so se ti pridelovali na polju.



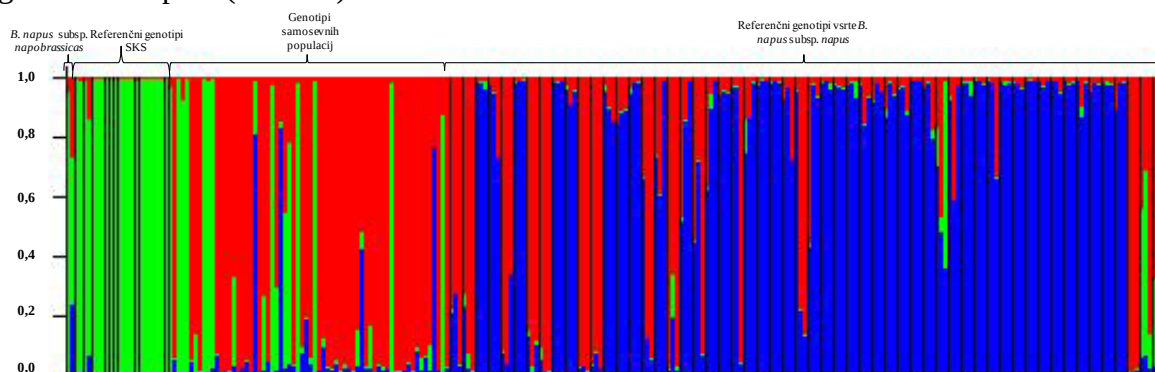
Slika 17: Prikaz genetske strukture referenčnih genotipov znotraj sort in samosevnih genotipov znotraj statističnih regij vzorčenja samosevnih populacij v obdobju 2007–2010 na podlagi treh genetskih skupin Y-os prikazuje oceno aposteriorne verjetnosti, da posamezen genotip pripada določeni skupini; vsak stolpec prikazuje genotip znotraj populacije, ki so ločene z navpičnimi črnimi linijami. Pri referenčnih sortah vsaka populacija predstavlja sorto, znotraj katere so trije genotipi, pri samosevnih populacijah pa populacija predstavlja genotipe, ki so bili v posameznem letu nabrani v določeni statistični regiji v Sloveniji.

Figure 17: Presentation of genetic structure of reference genotypes within varieties and volunteer genotypes inside statistical regions of sampling from 2007-2010 on the basis of three genetic clusters

Y axis represents the the estimation of aposterior probability, that individual genotype belongs to define genetic group, each bar represents the genotype inside population which are separated with vertikal black line. In reference varieties each population represents three genotypes within each variety, in volunteers, each population represents genotypes which were sampled in each year in defined statistical region in Slovenia.

4.1.3.2 Genetska primerjava samosevnih populacij z referenčnimi genotipi sort vrste *B. napus* subsp. *napus* in subsp. *napobrassica* ter z referenčnimi genotipi SKS-jev z uporabo petnajstih markerjev

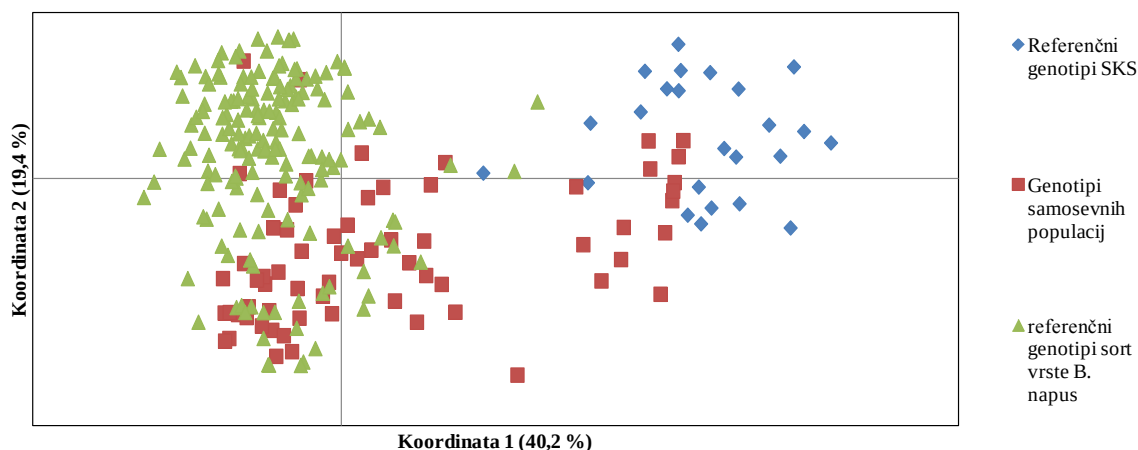
Na podlagi primerjav genetskih profilov genotipov samosevnih populacij, referenčnih genotipov sort in SKS-jev vrste *B. napus* smo na podlagi izbranega seta 15 markerjev ugotovili visoko stopnjo sorodnosti med njimi. Poleg tega smo pojasnili tudi vključenost SKS-jev v opraševalne relacije vrste *B. napus* in ustalitev prenesenih genov v samosevnih populacijah, ki so bile teoretično v spontana opraševanja vključene le eno rastno sezono. Na podlagi Bayesove klastrske analize smo vključene genotipe prav tako razdelili v tri genetske skupine (slika 18).



Slika 18: Ocena aposteriorne verjetnosti, da genotipi samosevnih populacij pripadajo trem genskim skupinam, ki združujejo referenčne sorte vrste *B. napus* (subsp. *napus* in subsp. *napobrassica*) in referenčne genotipe SKS-jev

Figure 18: Aposterior estimation of probability that volunteer genotypes belongs to three genetic clusters which are comprised from reference varieties of *B. napus* (ssp. *napus* and ssp. *napobrassica*) and from reference genotypes of SKR

Poleg tega je vključenost samosevnih genotipov tako v skupino referenčnih SKS-jev kot tudi v skupino referenčnih sort vrste *B. napus* pokazala tudi PCoA-analiza, kjer prve tri koordinate pojasnijo 70,7 % variabilnosti. Razporeditev posameznih genotipov na grafu PCoA-analize je prikazana na sliki 19.



Slika 19: PCoA-analiza genotipov samosevnih populacij in genotipov referenčnih sort vrste *B. napus* ter njenih SKS-jev

Figure 19: PCoA of genotypes from volunteer populations and genotypes of reference varieties of *B. napus* and its SKR

4.1.4 Izvor, genetska struktura in prostorska povezanost podivjanih populacij vrste *B. napus* v Sloveniji

V tej točki smo identificirali podivjane populacije glede na njihov izvor in ugotovili njihovo genetsko strukturo na podlagi primerjav z genetskimi profili referenčnih genotipov na dveh nivojih. Najprej na podlagi rezultatov genetske analize z uporabo 45 markerjev, kjer smo primerjali podivjane populacije z referenčnimi genotipi sort vrste *B. napus* subsp. *napus* (sorti 'Viva' in 'Bienvenue' sta iz tega dela izključeni). V tej analizi smo populacije obravnavali tudi glede na statistično regijo, v kateri so bile podivjane populacije vzorčene, poleg tega smo obravnavali tudi njihovo prostorsko in genetsko povezanost. V genetsko analizo z uporabo 15 markerjev pa smo vključili genotipe podivjanih populacij in genotipe vseh referenčnih sort ter SKS-je vrste *B. napus*, kjer smo ugotavljali predvsem strukturo genotipov podivjanih populacij, ki pripadajo določenim genskim skupinam, predvsem tistim, v katere so vključeni referenčni genotipi SKS-jev.

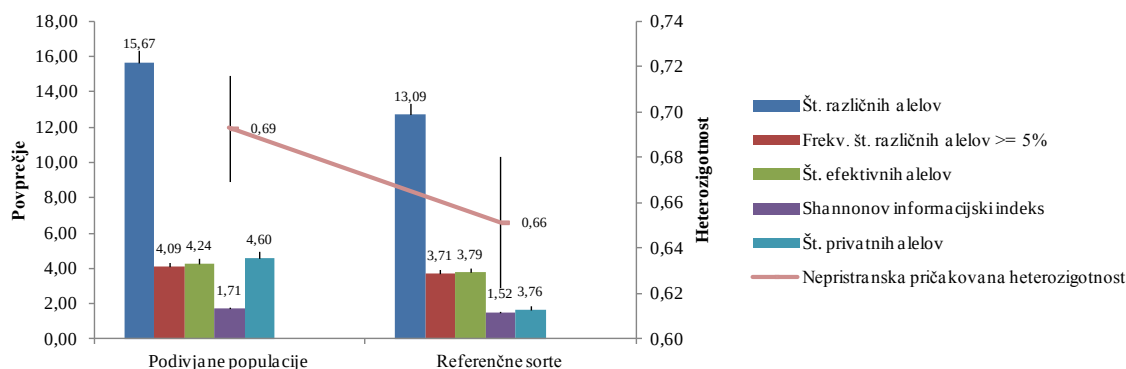
4.1.4.1 Genetska primerjava podivjanih populacij z referenčnimi genotipi sort vrste *B. napus* subsp. *napus* z uporabo petinštiridesetih markerjev

Opisne statistike izbranega seta 45 mikrosatelitnih markerjev so se v analizi genetske raznolikosti znotraj podivjanih populacij izkazale kot zelo informativne, saj povprečna PIC-vrednost na vseh lokusih znaša 0,668, genetska raznolikost 0,695, kar nakazuje 0,044-odstotni delež presežka heterozigotov od pričakovanega. Če omenjene parametre

variabilnosti primerjamo z izračunanimi znotraj genotipov referenčnih sort na vseh lokusih, so ti za te genotipe nekoliko manj informativni, saj PIC-vrednost znaša 0,420, prav tako pa je tudi genetska raznolikost nekoliko manjša (0,585). Opisani razliki med obema obravnavanima skupinama genotipov tako nakazujeta prisotnost tujih genov v genotipih podivjanih populacij, ki ne izvirajo iz referenčnih sort vrste *B. napus* subsp. *napus* in ki so se v preteklosti pridelovale v Sloveniji. Če primerjamo genetske profile podivjanih populacij z referenčnimi genotipi sort vrste *B. napus* subsp. *napus*, lahko ugotovimo, da se na podlagi števila ujemaajočih alelov noben genetski profil ne ujema v 100-odstotnem deležu, temveč v največ 78,21-odstotnem. Visoke deleže ujemanj na podlagi skupnih alelov smo našli tudi med posameznimi podivjanimi populacijami v naravi v različnih letih in tudi na različnih območjih Slovenije. V deležu do najmanj 70 % (ustreza 30-odstotni variabilni stopnji tujeprašnosti vrste *B. napus*) ujemaajočih se alelov smo našli 44 različnih genotipov podivjanih populacij, ki se ujemaajo z referenčnimi genotipi sort vrste *B. napus* subsp. *napobrassica*, in 75 genotipov podivjanih populacij, ki se glede na alelno strukturo med sabo ujemaajo v deležih med 70 in 78,21 %. Kot najbolj informativni lokusi s PIC-vrednostjo nad 0,6 za razločevanje med genotipi referenčnih sort in podivjanih populacij znotraj vrste *B. napus* subsp. *napus* so se izkazali lokusa Na12-C06 in Na12-E05, ki izvirata iz vrste *B. napus*, lokus Ni4-D09, ki izvira iz vrste *B. nigra*, in lokus RES1, ki izvira iz rodu *Brassica*. Sicer pa je povprečna PIC-vrednost na vseh lokusih v analizi znašala 0,445.

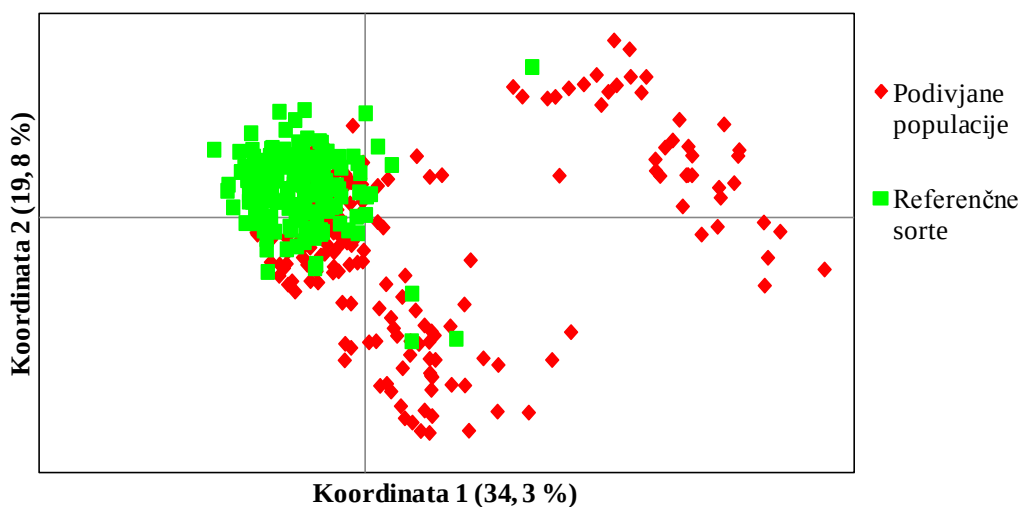
Vsi analizirani genotipi podivjanih populacij v vseh statističnih regijah v Sloveniji na vseh 45 lokusih ne ustrezajo zahtevam vrednosti HWE niti s statistično značilno stopnjo $p = 0,001$, medtem ko so vsi referenčni genotipi sort znotraj nje. Povprečen fiksacijski indeks F znotraj podivjanih populacij je dosegel vrednost blizu 0 ($F = 0,074$), medtem ko je bil povprečen fiksacijski indeks znotraj referenčnih sort negativen ($F = -0,046$). Povprečna stopnja prenosa genov (m) med referenčnimi sortami in podivjanimi populacijami je neodvisno od velikosti populacij na podlagi Barton-Slatkinove ocene znašala 2,003, povprečna frekvenca privatnih alelov pa 0,108.

Spremembe v strukturi alelov med podivjanimi populacijami na območju Slovenije v štiriletnem časovnem obdobju v primerjavi z alelno strukturo genotipov referenčnih sort vrste *B. napus* subsp. *napus* so prikazane na sliki 20. Ugotovili smo, da je število različnih alelov, njihova frekvenca in število efektivnih alelov večje pri podivjanih populacijah kot pri referenčnih sortah. Poleg tega je tudi število privatnih alelov mnogo višje pri podivjanih populacijah ($N_p = 4,60$) kot pri referenčnih sortah ($N_p = 3,76$), kar kaže na vnos tujih alelov v podivjane populacije, ki ne izvirajo iz referenčnih sort, ki so se pridelovale v Sloveniji od leta 1984 dalje.



Slika 20: Vzorci pojavljanja alelov v podivjanih populacijah in referenčnih sortah vrste *B. napus* subsp. *napus*
Figure 20: Allelic patterns in feral populations and reference varieties of *B. napus* ssp. *napus*

PCoA-analiza je na podlagi kovariančne matrike in standardizacije podatkov podala razporeditev genotipov podivjanih populacij in referenčnih sort, kot je prikazano na sliki 21. Skupno prve tri koordinate pojasnijo 67,2 % variabilnosti in razdelijo obravnavane genotipe v štiri večje genetske skupine, kjer samo ena vključuje skoraj vse referenčne genotipe (razen 4 zelenih kvadratov od skupno 162) skupaj s pripadajočimi podivjanimi, ki so si z njimi genetsko najbližje. Ostale tri skupine si delijo genotipe podivjanih populacij iz vseh območij Slovenije, poleg tega ena genetska skupina vključuje vse tri genotipe sorte 'Petranova', druga en genotip hibrida 'X08W984I', eno skupino pa sestavljajo le genotipi iz podivjanih populacij.



Slika 21 : Razporeditev genotipov podivjanih populacij in referenčnih sort v PCoA-analizi
Figure 21: Distribution of genotypes of feral populations and reference varieties in PCoA

Rezultate PCoA-analize in razporeditev genotipov v štiri genetske skupine smo potrdili tudi na podlagi *ad hoc* statistike v Bayesovi klastriški analizi, kjer je povprečna vrednost alfa znašala 0,047 ob sočasni oceni $\ln P(D) = -80749,0$. Poleg tega je bila izračunana genetska raznolikost znotraj treh genetskih skupin med 0,63 in 0,67, znotraj četrte skupine pa je bila višja, in sicer 0,78.

Na podlagi distančne matrike enakosti alelov (F-statistike) smo opravili tudi analizo AMOVA, kjer smo izračunali 3-odstotno molekularno varianco med populacijama

podivjanih in referenčnih genotipov, 7-odstotno med genotipi znotraj populacij in 90-odstotno molekulska variabilnost znotraj genotipov. Rezultati analize AMOVA na podlagi variance v alelnih dolžinah (R-statistike), ki upošteva tudi razvoj mikrosatelitnih mutacij, so pokazali, da je bila molekulska varianca med obema populacijama 14-odstotna, med genotipi znotraj populacije 79-odstotna in znotraj genotipov 7-odstotna.

4.1.4.2 Prostorska in genetska povezanost genotipov podivjanih populacij iz celotne Slovenije v štiriletnem časovnem obdobju z uporabo petinštiridesetih markerjev

Analiza je vključevala vse podivjane populacije, ki smo jih zbrali v desetih slovenskih statističnih regijah v obdobju 2007–2010.

Izračunani povprečni indeksi F-statistike za vse lokuse so bili naslednji: $F_{is} = -0,001$, $F_{it} = 0,070$ ter $F_{st} = 0,079$ ob 98,4-odstotnem deležu polimorfnihi lokusov za vse populacije. Povprečno število migrantov na vseh lokusih v vseh populacijah je bilo 3,77, povprečen fiksacijski indeks je znašal $-0,021$, povprečna stopnja tujeprašnosti pa 1,041. V preglednici 8 so predstavljene izračunane vrednosti parnih primerjav na podlagi Neijeve nepristranske genetske enakosti (pod diagonalo) in vrednosti F_{st} , izračunane na podlagi frekvenc alelov (nad diagonalo) podivjanih populacij med posameznimi statističnimi regijami.

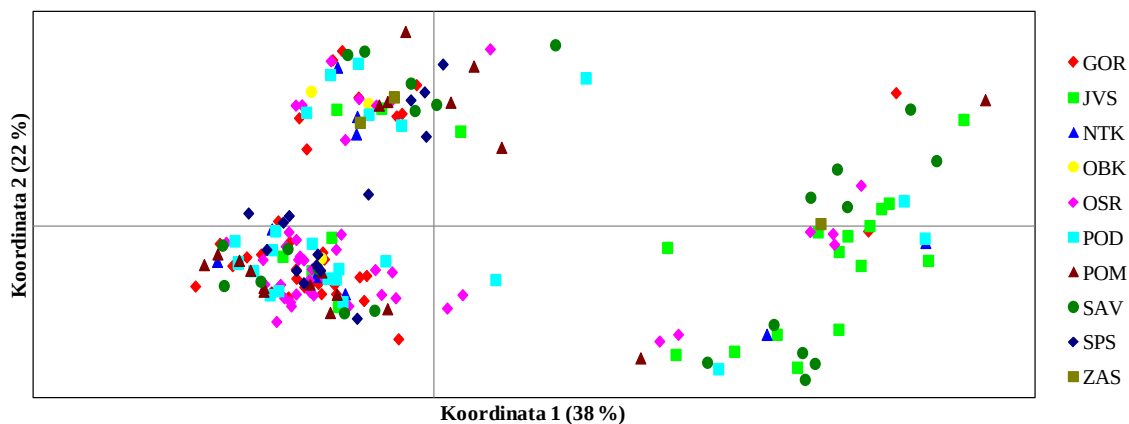
Preglednica 8: Vrednosti parnih primerjav podivjanih populacij glede na statistične regije na podlagi Neijeve nepristranske genetske enakosti (pod diagonalo) in vrednosti F_{st} , izračunane na podlagi frekvenc alelov (nad diagonalo)

Table 8: Values of pairwise comparisons of feral populations according to statistical regions based on Nei's unbiased genetic identity (under diagonal) and F_{st} values, based on allele frequencies (above diagonal)

	GOR	JVS	NTK	OBK	OSR	POD	POM	SAV	SPS	ZAS
GOR	*	0,042	0,022	0,078	0,007	0,014	0,018	0,023	0,019	0,072
JVS	0,860	*	0,040	0,104	0,037	0,037	0,047	0,021	0,053	0,071
NTK	1,001	0,912	*	0,093	0,021	0,022	0,029	0,021	0,028	0,072
OBK	0,918	0,794	0,903	*	0,076	0,082	0,082	0,092	0,092	0,122
OSR	1,006	0,867	0,997	0,919	*	0,013	0,019	0,020	0,021	0,072
POD	0,988	0,888	1,001	0,904	0,988	*	0,016	0,021	0,021	0,063
POM	0,985	0,866	0,992	0,917	0,973	0,990	*	0,024	0,024	0,070
SAV	0,951	0,962	1,005	0,855	0,953	0,967	0,967	*	0,030	0,062
SPS	0,986	0,851	1,000	0,901	0,974	0,976	0,976	0,953	*	0,068
ZAS	0,926	0,913	0,971	0,932	0,913	0,956	0,941	0,960	0,962	*

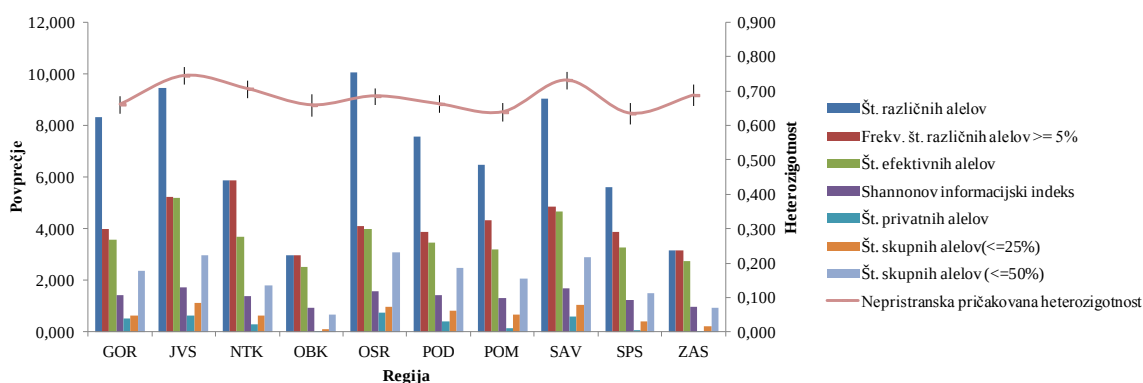
Iz preglednice 8 je razvidno, da so si podivjane populacije med posameznimi regijami genetsko zelo blizu, zato ne moremo predvidevati, da bi v kateri statistični regiji lahko prevladovala določena populacija, zaradi česar so tudi stopnje genske diferenciacije (F_{st}) podivjanih populacij med posameznimi regijami razmeroma nizke, vendar še vedno višje od 0, kar pomeni, da nobena izmed podivjanih populacij ni znotraj vrednosti HWE ($p < 0,05$). Da za podivjane populacije ni mogoče ugotoviti nekega specifičnega vzorca zastopanosti posameznih podivjanih genotipov znotraj regije in da se vsi genotipi pojavljajo po celotni Sloveniji v štiriletnem časovnem obdobju ne glede na izvor, smo ugotovili tudi s primerjavo genetske in geografske distančne matrike z Mantelovim testom. Mantelov koeficient r_{xy} , ki v naši analizi predstavlja merilo skladnosti obeh matrik, je dosegel pozitivno vrednost, in sicer 0,044 ($p = 0,01$). Poleg tega smo izračunali tudi 97-odstotno molekulska varianco med genotipi znotraj posameznih regij in le 3-odstotno molekulska varianco med posameznimi regijami. Razporeditev podivjanih genotipov

znotraj posamezne regije in med regijami je na podlagi PCoA-analize prikazana na sliki 22. Prve tri koordinate v PCoA-analizi pojasnijo skupno 74 % variabilnosti vseh podivjanih populacij.



Slika 22: Razporeditev podivjanih populacij znotraj statističnih regij po Sloveniji glede na rezultate PCoA-analize, pridobljene na podlagi njihove genetske povezanosti

Figure 22: The arrangement of feral populations inside statistical regions around Slovenia according to PCoA based on their genetic linkages



Slika 23: Aletna struktura podivjanih populacij in genetska raznolikost znotraj njih glede na njihovo geografsko pojavljanje v Sloveniji v obdobju 2007–2010

Figure 23: Allelic structure of feral populations and genetic diversity inside them according to their geographical appearance in Slovenia from 2007 to 2010

Genetska raznolikost in aletna struktura podivjanih populacij po posameznih regijah sta prikazani na sliki 23. Iz nje je razvidno, da smo najbolj raznolike podivjane populacije v štiriletnem časovnem obdobju našli znotraj regije jugovzhodna Slovenija ter notranjsko-kraške in savinjske regije, saj je bila tam genetska raznolikost podivjanih populacij (nepristranska, brez vpliva majhne populacije) z deležem nad 0,7. Poleg tega je bil pri podivjanih populacijah znotraj regije jugovzhodna Slovenija in savinjske regije najvišji tudi Shannonov informacijski indeks, ki je merilo za genetsko različnost in je presegel vrednost 1,6, visok pa je bil tudi znotraj osrednjeslovenske regije, kjer je znašal 1,57, medtem ko so se pri podivjanih populacijah znotraj ostalih statističnih regij omenjeni indeksi gibali med 0,9 in 1,4. Število privatnih alelov je bilo najvišje pri podivjanih populacijah znotraj osrednjeslovenske regije ($N_p = 0,76$), sledijo podivjane populacije

znotraj savinjske regije ($N_p = 0,62$), regije jugovzhodna Slovenija ($N_p = 0,60$) in gorenjske regije ($N_p = 0,51$). Najmanjše število privatnih alelov ($N_p = 0,22$) smo izračunali znotraj zasavske in obalno-kraške regije.

4.1.5 Prostorsko vrednotenje in identifikacija prenosa genov znotraj vrste *B. napus* iz različnih habitatov v štiriletnem časovnem obdobju

V analizo smo vključili vse posevke, samosevne in podivjane populacije vrste *B. napus*, ki smo jih v obdobju 2007–2010 vzorčili na terenu. Njihove genetske profile smo primerjali in ovrednotili z uporabo 45 markerjev.

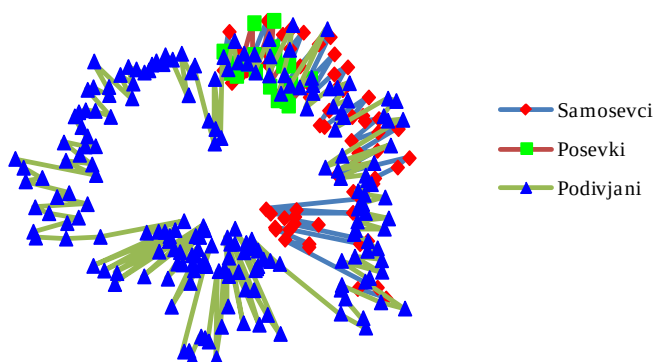
Skupna genetska raznolikost (nepristranska) na vseh 45 lokusih je najnižja znotraj posevkov in znaša 0,651, najvišja je znotraj samosevnih populacij in znaša 0,723, znotraj podivjanih populacij pa znaša 0,695. Te rezultate potrjujejo tudi rezultati Shannonovega indeksa, ki predstavlja merilo genetske različnosti z vrednostmi 1,73 za samosevne in 1,71 za podivjane populacije. V analizi je skupna povprečna vrednost polimorfizma za uspešno razločevanje med genotipi vrste *B. napus* iz različnih habitatov z izbranim setom 45 mikrosatelitnih markerjev znašala 0,650. Najbolj uspešno so ti markerji ločili genotipe znotraj samosevnih populacij ($PIC = 0,690$), najmanj uspešno pa znotraj vzorčenih posevkov ($PIC = 0,593$). Sicer pa so se kot najbolj informativni za ločevanje genotipov vrste *B. napus* iz različnih habitatov v štiriletnem časovnem obdobju ($PIC > 0,80$) izkazali lokusi Na12-G05, Na12-B05, Na14-G02, Na12-E06a in Na12-C06, ki tudi sicer izvirajo iz genoma vrste *B. napus*, lokusa Ol11-G11 in Ol12-E03, ki izvirata iz genoma vrste *B. oleracea*, ki je izvorno eden izmed staršev vrste *B. napus*, ter lokusov BRMS-036 in RES1, ki izvirata iz genoma rodu *Brassica*. Povprečni delež polimorfnihih lokusov v analizi je bil 99,3 %.

Vrednost števila različnih alelov, ki predstavlja enega izmed glavnih parametrov genetske raznolikosti med vsemi tremi pojavnimi oblikami vrste *B. napus* v štiriletnem obdobju v evolucijski biologiji, je bila najvišja na lokusu Ni4-D09 ($R = 4,81$), ki izvira iz vrste *B. nigra*, najnižje pa je bilo število različnih alelov na lokusu BRMS050 ($R = 1,99$), ki izvira iz rodu *Brassica*. Sicer pa je bila povprečna vrednost na obravnavanih lokusih 3,46. Naslednja povezovalna statistika prej opisanih vrednosti je število privatnih alelov, kjer smo najvišjega izračunali znotraj podivjanih populacij ($N_p = 3,73$), sledi vrednost znotraj samosevnih populacij ($N_p = 1,04$), najnižje število privatnih alelov pa smo izračunali znotraj posevkov ($N_p = 0,13$). Da se največ naključnih oprašitev zgodi prav znotraj podivjanih populacij, ki so najdlje izpostavljene spontanemu oprašitvam v naravi, smo dokazali tudi z izračunom fiksacijskega indeksa, ki je znotraj podivjanih populacij dosegel najvišjo pozitivno vrednost ($F = 0,074$). Malenkost nižjo vrednost smo izračunali znotraj samosevnih populacij ($F = 0,072$), najnižja in hkrati negativna vrednost pa je bila izračunana znotraj posevkov ($F = -0,027$), kar nakazuje na usmerjeno selekcijo, saj so ti genotipi genetsko podobni referenčnim genotipom, ki se pridelujejo v Sloveniji. Izračunali smo tudi, da nobena izmed podivjanih in samosevnih populacij na nobenem izmed obravnavanih lokusov ni znotraj vrednosti HWE, kar lahko trdimo s stopnjo verjetnosti $p < 0,05$, medtem ko genotipi posevkov na 20 lokusih ustrezajo zahtevam vrednosti HWE. Povprečna vrednost F_{is} znotraj vseh lokusov in vseh treh skupin genotipov, ki izvirajo iz različnih habitatov, je znašala 0,050 in predstavlja oprašitveni koeficient med temi

skupinami genotipov na izbranih lokusih. Ta pozitivna vrednost razlaga, da obstaja (majhna) verjetnost, da sta oba alela v posameznem genotipu enaka po izvoru, kar hkrati predstavlja tudi rahel presežek heterozigotov znotraj vseh pojavnih oblik vrste *B. napus* v naravi. Povprečna stopnja genetske diferenciacije na podlagi frekvenc alelov (F_{st}) na izbranih lokusih znotraj posevkov, samosevnih in podivjanih populacij v naravi znaša 0,068. Povprečna vrednost F_{it} na vseh obravnavanih lokusih in znotraj vseh treh pojavnih oblik vrste *B. napus* v Sloveniji pa znaša 0,026. Ta vrednost vključuje vplive predpostavk, da ni prisotne naključne oprašitve znotraj pojavnih oblik v različnih habitatih in da ni genetske diferenciacije med njimi.

Povprečna stopnja tujeprašnosti med samosevnimi pojavnimi oblikami vrste *B. napus* v naravi skozi štiriletno časovno obdobje je znašala 0,865, znotraj posevkov 1,055, znotraj podivjanih populacij pa 0,862. Povprečna vrednost števila migrantov med vsemi tremi pojavnimi oblikami vrste *B. napus* (posevki, samosevne, podivjane) skozi štiri generacije je znašala 22,1. Najvišjo ($N_m > 70$) smo izračunali na lokusih BN6A2 in MR183, najnižjo pa na lokusu Ni4-H04 ($N_m = 0,72$). Najvišja stopnja izmenjave genov je bila izračunana med samosevnimi in podivjanimi populacijami skozi štiriletno obdobje ($N_m = 58,02$), sledi izmenjava med samosevnimi populacijami in posevki ($N_m = 10,92$), še nižja pa je med posevki in podivjanimi populacijami ($N_m = 8,32$).

Prve tri koordinate PCoA-analize skupno pojasnijo 73,98 % genetske variabilnosti na podlagi kovariančne matrike in standardizacije podatkov, od tega prva koordinata pojasni 39,24 %, druga 21,10 %, tretja pa 13,34 %. Razporeditev genotipov glede na habitat, kjer se je pojavna oblika vrste *B. napus* nahajala, je prikazana na sliki 24. To razporeditev genotipov potrjujejo tudi rezultati analize AMOVA prek vrednosti Φ , kjer molekulska varianca med obravnavanimi populacijami (posevki, samosevci, podivjani) znaša 1 % in kar 99-odstotni delež molekulske variance znotraj populacij, kar pomeni, da se genetsko podobni genotipi pojavljajo v različnih letih in v različnih pojavnih oblikah po celotni Sloveniji.



Slika 24: Razporeditev genotipov vrste *B. napus* iz različnih habitatov v PCoA-analizi
Figure 24: Exploration of genotypes of *B. napus* from different habitats in PCoA

Primerjava genetske in geografske distančne matrike genotipov vrste *B. napus* iz različnih habitatov v Sloveniji, narejena z Mantelovim testom, je pokazala negativno korelacijo med obema obravnavanjema ($r_{xy} = -0,027$, $p = 0,01$), kar odraža slabo genetsko in prostorsko

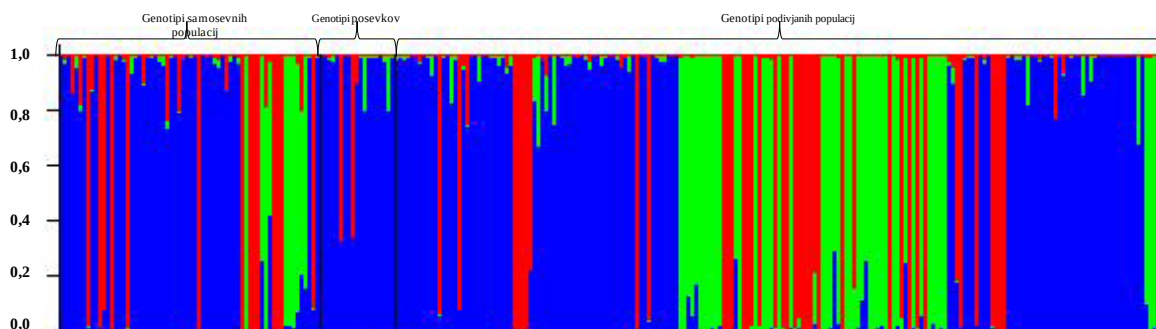
skladnost obeh matrik ter s tem slabo genetsko in geografsko povezanost vseh treh pojavnih oblik vrste *B. napus* v Sloveniji. V LSA-analizi smo na podlagi predhodnega izračuna najbližjih sosedov ($N = 1$) izračunali povprečno vrednost lokalnega indikatorja prostorske avtokorelacije – $r = 0,048$. Izračunana vrednost r je pozitivna in odraža majhno stopnjo geografske povezanosti vzorčenih lokacij, saj smo vzorčili po različnih regijah znotraj Slovenije, kjer so razdalje relativno majhne.

V klasterski analizi smo na podlagi Bayesovega pristopa izračunali, da posevki, samosevci in podivjane populacije, zbrani po celotni Sloveniji v obdobju 2007–2010, pripadajo trem genetskim skupinam. Njihova genetska struktura glede na genetsko pripadnost je prikazana v preglednici 9 in na sliki 25.

Preglednica 9: Delež vključenosti genotipov iz različnih habitatov v tri genetske skupine na podlagi Bayesove klasterske analize

Table 9: Proportion of membership of genotypes from different habitats in three genetic clusters based on Bayesian clustering method

Oblika	Genetska skupina 1	Genetska skupina 2	Genetska skupina 3
Samosevci	0,134	0,236	0,630
Posevki	0,027	0,078	0,895
Podivjani	0,252	0,211	0,537



Slika 25: Genetska pripadnost posameznih genotipov iz različnih habitatov po celotni Sloveniji v obdobju 2007–2010

Figure 25: Genetic membership of individual genotypes from different habitats around Slovenia from 2007 to 2010

4.1.6 Spremembe v alelni strukturi genotipov, ki so bili na istih lokacijah v Sloveniji vzorčeni v različnih letih znotraj štiriletnega obdobja

V analizo smo vključili genotipe samosevnih in podivjanih populacij iz sedmih lokacij v Sloveniji, kjer smo v različnih letih vzorčili več kot enkrat (seznam je v prilogi F). Njihove genetske profile smo primerjali na 45 lokusih. Ujemajoči odstotek alelov med populacijami v različnih letih vzorčenja na isti lokaciji je predstavljen v preglednici 10.

Preglednica 10: Primerjava genetskih profilov genotipov, ki so bili na isti lokaciji vzorčeni v različnih letih
Table 10: Comparison of genetic profiles of genotypes sampled on the same location in different years

Lokacija 1	Status 1	Lokacija 2	Status 2	Delež ujemajočih se alelov (%)	Št. primerjanih alelov
78/10 Logatec	podivjana	49/09 Logatec	podivjana	52,70	74
40/09 Struževo	podivjana	26/07b Struževo	podivjana	46,25	80
40/09 Struževo	podivjana	64/10 Struževo	podivjana	45,00	80
64/10 Struževo	podivjana	26/07b Struževo	samosevec	43,18	88
30/08 Žeje	podivjana	86/10 Žeje	podivjana	44,05	84
06/10 Kidričevo	podivjana	02/09 Krožni Kidričevo	podivjana	34,62	52
23/09 Podzemelj	podivjana	48/10 Podzemelj	podivjana	32,50	80
64/09 Čeplje	podivjana	05/08 Čeplje	podivjana	28,21	78
24/10 Kapla	podivjana	07/08 Kapla	podivjana	25,00	80
65/09 Kapla	samosevec	07/08 Kapla	podivjana	24,39	82
65/09 Kapla	samosevec	24/10 Kapla	podivjana	23,68	76

Iz preglednice 10 je razvidno, da so deleži ujemajočih se alelov med genotipi, vzorčenimi na isti lokacijah v različnih letih, relativno nizki, glede na to, da smo predvidevali, da gre za isti izvorni material, torej seme, ki se skozi generacije lahko samoohranja v talni semenski banki. Izračuni analize AMOVA, narejene na podlagi alelne distančne matrike, kažejo, da je delež molekulske variance med posameznimi genotipi v različnih letih znotraj iste lokacije 18-odstoten. Vsak vzorčen genotip smo na isti lokaciji v različnem letu vzorčenja med sabo primerjali na podlagi uporabe LRM-algoritma, ki je razvit posebej za populacije, ki so izpostavljene spontanemu prenosu genov v naravi, in predstavlja tudi neko mero ohranjanja ter ustalitve genov v teh »neznanih« populacijah (preglednica 11) na geografsko istih pozicijah z uporabo velikega števila mikrosatelitnih markerjev. V preglednici 11 so prikazani tudi parametri in indeksi, ki vrednotijo genetsko različnost genotipov na isti lokaciji v različnih letih (število privatnih alelov, pričakovana heterozigotnost, fiksacijski indeks, Shannonov informacijski indeks), ter tudi stopnja tujeprašnosti (t) znotraj iste lokacije na skupno 45 lokusih.

Preglednica 11: Parametri genetskih primerjav genotipov, vzorčenih na istih lokacijah v različnih letih
Vključno z oceno LRM-algoritma (LRM), števila privatnih alelov (Np), pričakovane heterozigotnosti (He), fiksacijskega indeksa (F), Shannonovega indeksa (I) in stopnje tujeprašnosti (t).

Table 11: Parameters of genetic comparisons of genotypes sampled on the same locations in different years
Including LRM estimator (LRM), number of private alleles (Np), expected heterozygosity (He), fixation index (F), Shannon's index (I) and outcrossing rate (t).

Lokacija 1	Lokacija 2	LRM	Np	He	F	I	t
78/10 Logatec	49/09 Logatec	0,013	0,31	0,422	-0,482	0,675	2,860
40/09 Struževo	26/07b Struževo	-0,007	0,64	0,560	-0,234	0,980	1,610
40/09 Struževo	64/10 Struževo	-0,007					
64/10 Struževo	26/07b Struževo	-0,018					
30/08 Žeje	86/10 Žeje	0,016	0,40	0,503	-0,385	0,822	2,250
06/10 Kidričevo	02/09 Krožni Kidričevo	-0,031	0,31	0,394	-0,376	0,608	2,207
23/09 Podzemelj	48/10 Podzemelj	0,004	0,80	0,522	-0,297	0,865	1,843
64/09 Čeplje	05/08 Čeplje	-0,053	0,53	0,456	-0,120	0,762	1,273
24/10 Kapla	07/08 Kapla	-0,024	1,00	0,637	-0,048	1,172	1,099
65/09 Kapla	07/08 Kapla	-0,051					
65/09 Kapla	24/10 Kapla	-0,080					

Na podlagi LRM-vrednosti v preglednici 11 smo ugotovili, da lahko znotraj lokacij Logatec, Žeje in Podzemelj (sivo obarvana polja) sklepamo na skupen izvor genotipov, saj so njihove vrednosti pozitivne. Da je v letih, ko so bile rastline na omenjenih lokacijah vključene v spontana križanja, prišlo do oprašitev in ustalitve prenesenih genov, pa pričajo visoke vrednosti Shannonovega indeksa genetske različnosti. Genetsko najmanj raznolika sta genotipa na lokacijah Logatec in (krožni) Kidričevo, kjer sta vrednosti H_e in I tudi najnižji, kar sovпада tudi z deležem ujemajočih se alelov med genotipoma znotraj obeh lokacij iz preglednice 10. Število privatnih alelov, ki so se, kot kaže, ustalili v populaciji, ki se je v obdobju 2008–2010 pojavljala na lokaciji Kapla, je bilo izmed vseh najvišje ($N_p = 1$). Fiksacijski indeksi na vseh lokacijah so bili negativni, kar pomeni, da je med analiziranimi genotipi znotraj lokacij v eni (ali več) generaciji prišlo do usmerjene oprašitve oziroma heterotične selekcije in ustalitve novih genov v populacijo, kar smo ugotovili tudi z izračunom vrednosti H_{WE} , saj so bili genotipi na isti lokacijah znotraj nje ($p < 0,05$). Povprečno število migrantov na vseh lokusih je znašalo 0,739, kot najbolj učinkovit za določevanje prenosa genov znotraj istih lokacij v različnih letih se je izkazal lokus Na10-A08 ($N_m = 1,67$), najmanj ustrezen pa je bil v tej analizi lokus Na12-C08 ($N_m = 0,07$).

4.1.7 Genetska analiza genskega sklada referenčnih genotipov vrste *B. napus* in referenčnih genotipov njenih spolno kompatibilnih sorodnikov znotraj družine Brassicaceae, ki se pojavljajo v slovenskem pridelovalnem prostoru

V tej točki smo prikazali osnovno genetsko strukturo vseh referenčnih genotipov, ki so vključeni v doktorsko disertacijo, in stopnjo genetske raznolikosti obravnavanih genotipov znotraj družine Brassicaceae na izbranem setu 15 markerjev. V preglednici 12 so prikazani parametri variabilnosti in indeksi fiksacij, vključno s številom migrantov po posameznih lokusih.

Preglednica 12: Parametri variabilnosti, indeksi fiksacij in število migrantov po posameznih lokusih

H_e – pričakovana heterozigotnost, H_o – obravnavana heterozigotnost, PIC – informacijska vrednost polimorfizma, indeksi fiksacij (Fis, Fit, Fst) in število migrantov (N_m) po posameznih lokusih.

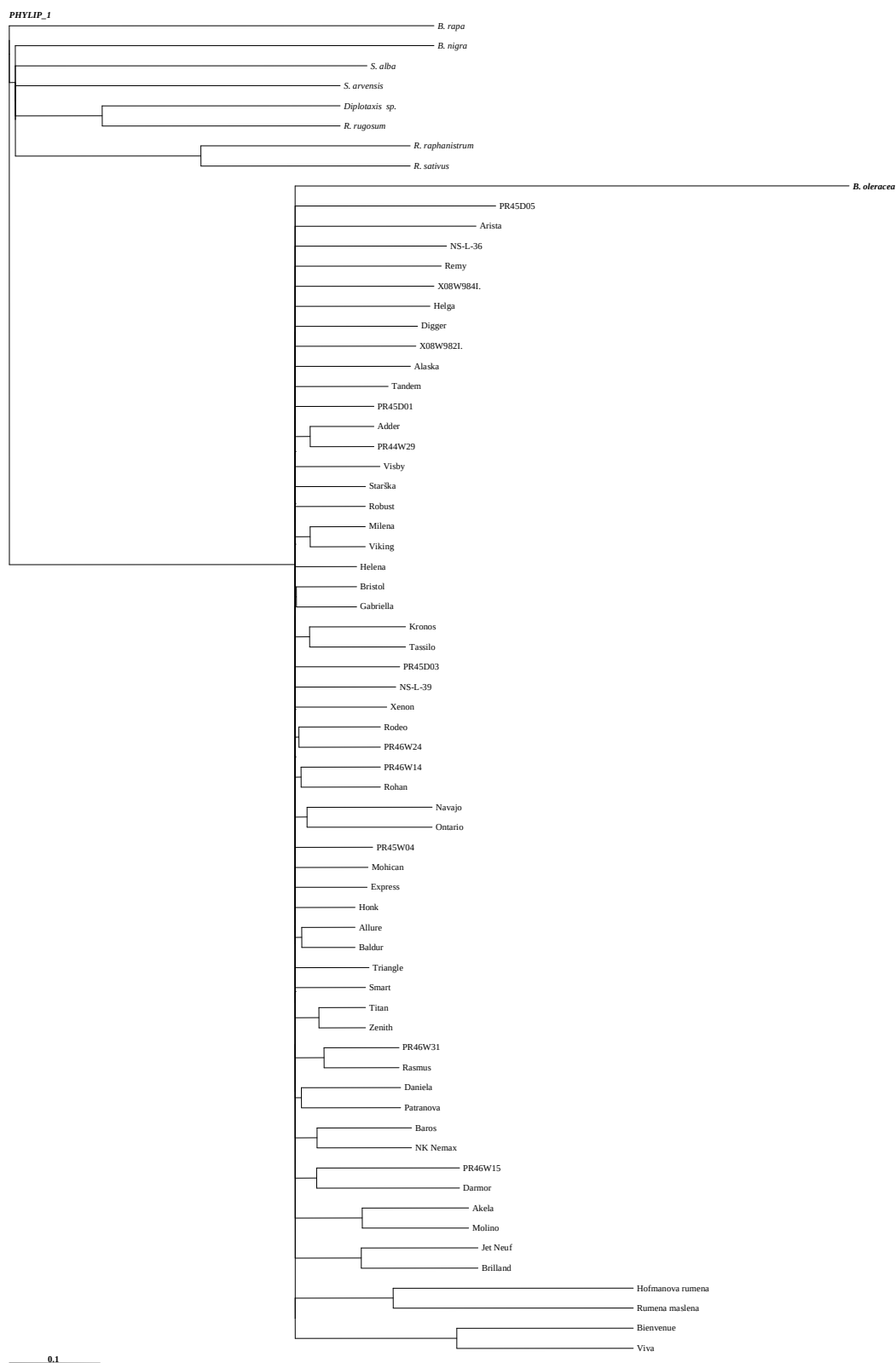
Table 12: Parameters of variability, fixation indices and number of migrants on each locus

H_e -expected heterozygosity, H_o -observed heterozygosity, PIC-polymorphic information content, fixation indices (Fis, Fit, Fst) and number of migrants (N_m) on each locus.

Lokus	Št. alelov	H_e	H_o	PIC	Fis	Fit	Fst	N_m
Na12-A07	19	0,658	0,649	0,633	-0,451	0,051	0,346	0,472
Ni4-H04	16	0,827	0,386	0,806	-0,280	0,653	0,729	0,093
OI12-E03	14	0,821	0,932	0,796	-0,517	-0,080	0,288	0,619
Ra2-A01	15	0,673	0,947	0,617	-0,695	-0,337	0,211	0,934
BN83B1	17	0,287	0,143	0,283	-0,123	0,590	0,635	0,144
Na12-C08	23	0,846	0,593	0,833	-0,165	0,377	0,465	0,287
Ni4-D09	19	0,832	0,895	0,815	-0,456	-0,012	0,305	0,571
OI13-E08	19	0,693	0,747	0,648	-0,500	-0,059	0,294	0,601
Ra3-H10	18	0,708	0,796	0,679	-0,540	-0,075	0,302	0,578
MR187	19	0,555	0,365	0,542	-0,112	0,373	0,436	0,323
Na10-A08	26	0,857	0,785	0,845	-0,395	0,097	0,353	0,459
Ni3-G04b	16	0,591	0,780	0,516	-0,694	-0,258	0,257	0,721
OI12-D05	17	0,751	0,693	0,712	-0,324	0,102	0,322	0,527
Ra2-E12	21	0,804	0,753	0,783	-0,274	0,095	0,290	0,613
BRMS-050	20	0,478	0,348	0,459	-0,231	0,354	0,475	0,276
Povprečje	18,6	0,692	0,654	0,664	-0,384	0,125	0,381	0,481

Kot najbolj informativni ($PIC > 0,8$) za razločevanje med rodovi, vrstami in sortami genotipov znotraj družine Brassicaceae, ki se pojavljajo v slovenskem pridelovalnem prostoru, so se izkazali mikrosatelitni markerji Ni4-H04, Na12-C08, Ni4-D09 in Na10-A08 (preglednica 12), ki izvirajo iz vrst *B. napus* in *B. nigra*. Statistično značilno vrednost določanja sprememb v genetski strukturi na posameznem lokusu ($p < 0,05$) smo na osnovi hierarhičnega islandskega modela izračunali na lokusih Ra3-H10 in Na10-A08, zato lahko na podlagi izračunov sklepamo, da stopnja prenosa genov na teh dveh lokusih vpliva na mikroevolucijske procese in naravno selekcijo. Poleg tega je na teh dveh lokusih tudi dejansko izračunana stopnja prenosa genov visoka, vendar ne najvišja, saj je bila ta izračunana na lokusu Ra2-A01, ki izvira iz vrste *B. rapa*. Največje število alelov smo določili na lokusu Na12-C08 (23), delež polimorfnih lokusov v analizi vseh vključenih genotipov pa je bil 82-odstoten (ta vrednost ni prikazana v preglednici 12). Vrednost Fis je bila na vseh lokusih negativna, povprečna pa $-0,384$, kar pomeni, da so si genotipi v analizi na obravnavanih lokusih v povprečju precej različni, kar pojasnjuje tudi povprečna vrednost He (0,692) (preglednica 12). Največje število migrantov na vseh 15 lokusih ($N_m > 3,00$) smo izračunali med naslednjimi referenčnimi sortami vrste *B. napus*: 'Titan', 'Smart', 'Zenith', 'Bristol', 'Honk', 'Robust', 'Triangle', 'Allure' in 'Helga'. Povprečno število migrantov (m) med vsemi referenčnimi sortami vrste *B. napus* in njenimi SKS-ji, ki so se pojavljali v Sloveniji v obdobju 1984–2010, je bilo 0,525, pri čemer je povprečna frekvenca privatnih alelov znašala 0,285.

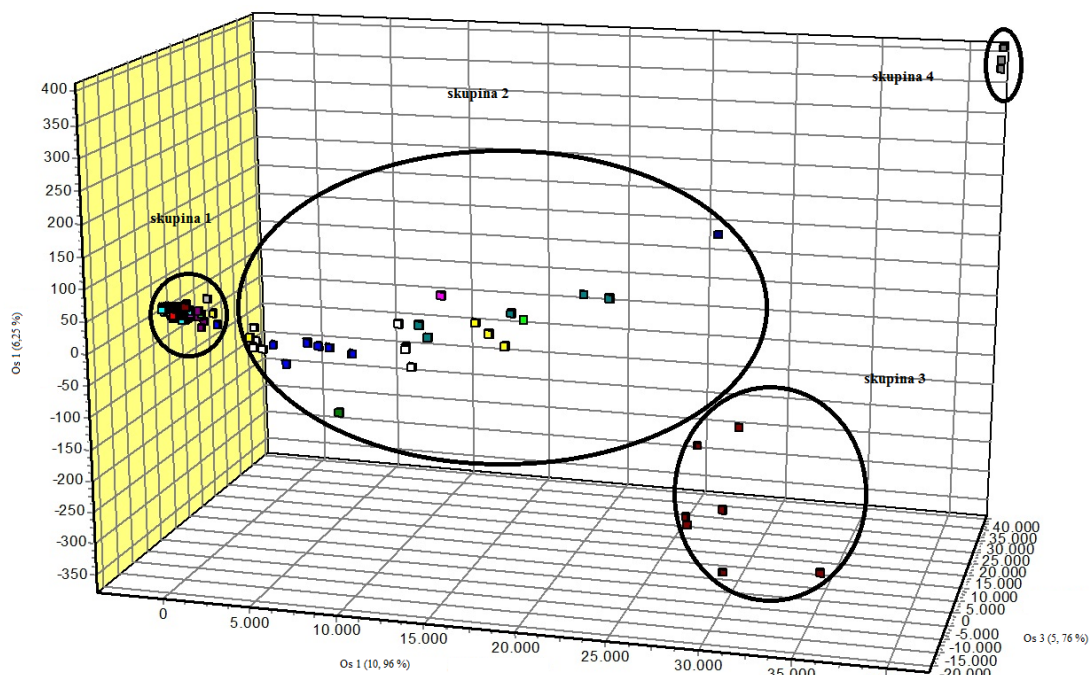
Genetske povezave vseh sort vrste *B. napus*, ki vključujejo podzemni kolerabi, oljne in krmne sorte ter ozimne in jare sorte z njihovimi SKS-ji, ki se pridelujejo ali pojavljajo v Sloveniji tudi kot plevelne rastline, so predstavljene na sliki 26. Na podlagi prikaza filogenetskega drevesa, kjer smo na podlagi Neijeve standardne genetske razdalje med genotipi uporabili UPGMA-metodo združevanja, lahko s splošnega vidika sklepamo na dve genetsko različni skupini referenčnih sort. Prva skupina vključuje genotipe SKS-jev vrste *B. napus*, ki se pojavljajo v Sloveniji, razen vrste *B. oleracea*, ki je genetsko nekoliko bližje genotipom vrste *B. napus* in je zato vključena v drugo skupino. Poleg tega bi lahko drugo skupino v grobem razdelili tudi na podskupino, ki vključuje obe podzemni kolerabi in dve »stari« sorti vrste *B. napus* ('Viva' in 'Bienvenue').



Slika 26: Filogenetsko drevo sort vrste *B. napus* in njenih SKS-jev, ki so se v Sloveniji pojavljali v obdobju 1984–2010

Figure 26: Phylogenetic tree of varieties of *B. napus* and its SKR, which have appeared in a period 1984–2010

Tudi v FCA-analizo s štirimi dejavniki smo vključili vse omenjene genotipe referenčnih sort. Tako smo na podlagi povezav med genotipi in aleli na 15 lokusih dobili razporeditev, ki je prikazana na sliki 27. Skupno prve tri osi pojasnijo 22,97 % variabilnosti in razdelijo referenčne genotipe v štiri skupine. Skupina 1 vključuje le genotipe vrste *B. napus* subsp. *napus*, v skupini 2 so združeni genotipi vrste *B. napus* subsp. *napobrassica* in večina genotipov SKS-jev, razen genotipov iz rodu *Diplotaxis*, ki sestavljajo skupino 3, in genotipov vrste *S. alba*, ki sestavljajo skupino 4.

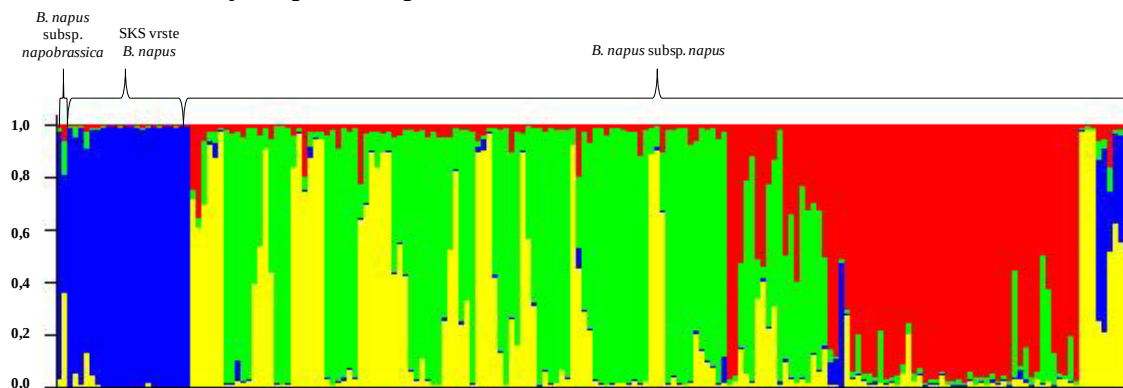


Slika 27: Razporeditev referenčnih genotipov vrste *B. napus* in njenih SKS-jev v štiri skupine glede na rezultate FCA-analize

Figure 27: The arrangement of reference genotypes of *B. napus* and its SKR in four groups according to FCA results

Glede na genetski izvor in na podlagi rezultatov UPGMA- in FCA-analize smo predhodno genotipe referenčnih sort razporedili v tri skupine, ki smo jih nato vključili v analizo AMOVA. Prva skupina je vključevala vse referenčne genotipe sort SKS-jev vrste *B. napus*, v drugo skupino so bili vključeni referenčni genotipi sort vrste *B. napus* subsp. *napus*, tretjo skupino pa so sestavljali genotipi vrste *B. napus* subsp. *napobrassica*. Delež genetske variabilnosti med temi tremi skupinami je znašal 19,76 %, genetska variabilnost med populacijami znotraj skupin (sorte oziroma rodovi pri SKS-jih) pa 9,42 %. Genetska variabilnost med genotipi znotraj populacij (sorte pri vrsti *B. napus* oziroma rodovi pri njenih SKS-jih) je bila negativna, in sicer -17,43 %, medtem ko je bila genetska variabilnost znotraj genotipov najvišja (88,25 %). Negativna vrednost molekulske variabilnosti pomeni obstoj panmiksije (naključna oprašitev) med genotipi znotraj sort vrste *B. napus* in znotraj rodov njenih SKS-jev, kar smo potrdili tudi z izračunano negativno vrednostjo F_{is} (-0,246). Znotraj analize AMOVA smo izračunali tudi ostale vrednosti fiksacijskih indeksov, ki so bile vse pozitivne. Indeks F_{sc} , ki obravnava genetsko raznolikost med genotipi sort in rodov znotraj skupin, je znašal 0,117, indeks F_{ct} , ki označuje genetsko raznolikost sort in rodov med skupinami, pa je znašal 0,197.

Rezultate FCA-analize je potrdila klastrska analiza, opravljena na podlagi Bayesovega pristopa, kjer smo določili štiri genetske skupine, v katere so razvrščeni obravnavani genotipi genskega sklada znotraj družine Brassicaceae, ki se pojavljajo v Sloveniji. Njihova genetska struktura in pripadnost sta prikazani na sliki 28. Realne štiri genetske skupine v analizi se med sabo genetsko precej razlikujejo, saj je izračunana genetska raznolikost znotraj skupin v razponu 0,593–0,835.



Slika 28: Genetska struktura referenčnih genotipov vrste *B. napus* in njenih SKS-jev, razdeljena v štiri genetske skupine na podlagi Bayesove klastrske analize

Figure 28: Genetic structure of reference genotypes of *B. napus* and its SKR in four genetic groups according to Bayesian cluster approach

4.1.8 Prostorske povezave in genetska struktura spolno kompatibilnih sorodnikov vrste *B. napus*, ki se pojavljajo v slovenskem pridelovalnem prostoru

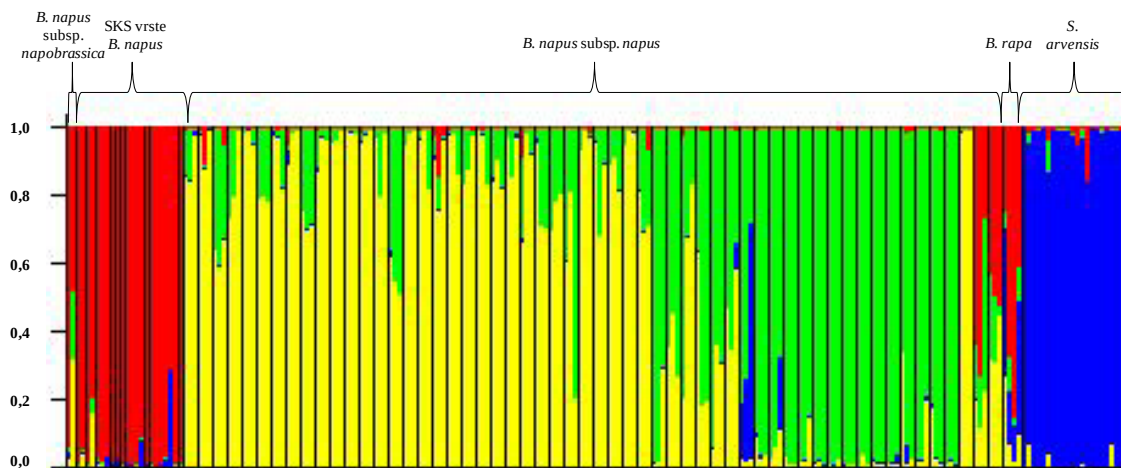
V času terenskega dela po celotni Sloveniji v obdobju 2007–2010 smo v času cvetenja vrste *B. napus* izmed vseh SKS-jev vrste *B. napus* zbrali rastlinski material vrst *B. rapa* in *S. arvensis* na skupno 26 lokacijah, kar je že bilo opisano v točki 4.1.1.2 in je razvidno tudi iz priloge G. Njihovo medsebojno genetsko in prostorsko povezanost smo vrednotili z uporabo 45 markerjev, genetsko primerjavo z vsemi referenčnimi genotipi vrste *B. napus* in njenimi SKS-ji pa z uporabo 15 markerjev.

Izmed vseh 45 mikrosatelitnih markerjev se je v genetski analizi izkazalo 91,1 % polimorfni lokusov znotraj podivjanih populacij vrste *B. rapa* in 95,6 % znotraj podivjanih populacij *S. arvensis* iz različnih habitatov. Najbolj učinkovito smo ti dve vrsti ločili na dveh lokusih, saj bi v primeru njune uporabe uspešno genetsko razločevanje opravili že na podlagi kvalitativnega PCR-profila na agaroznem gelu. Gre za lokus Ra2-A10, ki se je uspešno namnožil le pri genotipih vrste *S. arvensis*, in za lokus Na12-C08, na katerem je bila namnožitev uspešna le pri genotipih vrste *B. rapa*. Shannonov informacijski indeks genetske različnosti med genotipi vrste *B. rapa* je znašal 1,186, kar pomeni, da so bile te populacije po celotni Sloveniji nekoliko manj raznolike kot populacije vrste *S. arvensis*, kjer je bila vrednost Shannonovega indeksa 1,607. Število migrantov je bilo za obe populaciji najvišje ($N_m > 12$) na lokusih Ni4-E08, Na12-A08 in Ol12-B05. Sicer pa je bila povprečna vrednost števila migrantov na vseh 45 lokusih med obema vrstama v naravi 1,288. Vrednost fiksacijskega indeksa pri vrsti *B. rapa* je nekoliko nižja in je bližje 0 ($F = 0,101$), pri vrsti *S. arvensis* pa 0,258, kar nakazuje na višjo prisotnost naključnih oprašitev v naravi. To potrjujeta tudi stopnji tujeprašnosti, ki sta za populacije *B. rapa* 0,817, za *S. arvensis* pa 0,589. Poleg tega smo na podlagi izračunov

odstopanja obeh vrst od vrednosti HWE ugotovili, da odstopanje populacij *S. arvensis* na 19 lokusih ni statistično značilno, za ostale lokuse pa je ($p < 0,05$), medtem ko je odstopanje od vrednosti HWE znotraj populacij *B. rapa* statistično značilno le na lokusu Ni4-G04 ($p < 0,05$). Iz navedenih izračunov lahko sklepamo, da so populacije vrste *S. arvensis* v naravi prisotne kot podivjane ali plevelne že dalj časa in se lahko tam tudi samoohranjajo iz generacije v generacijo ter postajajo vedno bolj podobne naravnim populacijam. To dokazuje tudi primerjava genetske in geografske skladnosti vrst *B. rapa* in *S. arvensis* znotraj slovenskega pridelovalnega prostora, saj Mantelov koeficient skladnosti obeh matrik (r_{xy}) znaša 0,331 ($p = 0,01$). Izračunana vrednost tako nakazuje, da obstaja prostorska in genetska povezava med obravnavanimi populacijami obeh vrst znotraj Slovenije.

Delež molekulske variabilnosti med obema vrstama na podlagi F-statistike znaša 12 %, med genotipi znotraj vrste 32 %, znotraj genotipov pa 56 %. Analiza AMOVA na podlagi R-statistike, ki upošteva tudi mutacije, ki se lahko prek samoohranjenih generacij pojavljajo v naravnih populacijah, pa pokaže, da delež molekulske variabilnosti med obema vrstama znaša 10 %, med posameznimi genotipi 84 % in znotraj genotipov le 6 %.

V analizi genetske raznolikosti in primerjave v naravi zbranih genotipov vrst *B. rapa* in *S. arvensis* z vsemi referenčnimi genotipi sort vrste *B. napus* in njenimi SKS-ji smo na podlagi 15 lokusov izračunali, da je povprečno število migrantov med vsemi genotipi v tej analizi 0,478. Primerjava njihove genetske strukture razvršča obravnavane genotipe v klasterski analizi v štiri genetske skupine, kjer je povprečna vrednost alfa 0,0386, $\ln P(D)$ pa je $-10,721$. Pripadnost genotipov posamezni genetski skupini je prikazana na sliki 29.



Slika 29: Pripadnost genotipov vrst *B. rapa* in *S. arvensis*, vključno z referenčnimi genotipi vrste *B. napus* in njenimi SKS-ji, ki se pojavljajo v Sloveniji

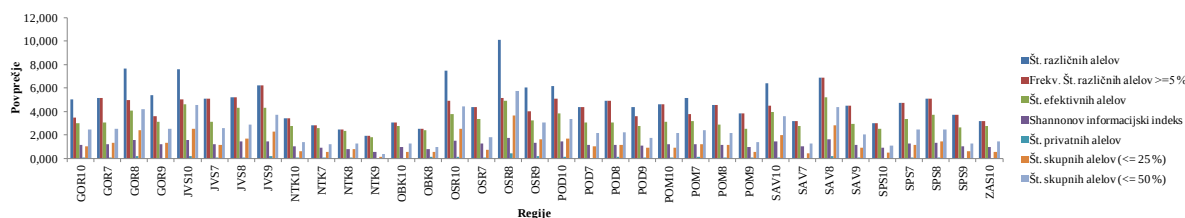
Figure 29: The membership of genotypes from *B. rapa* and *S. arvensis* including reference genotypes of *B. napus* and its SKR, which are appeared in Slovenia

Rezultati PCoA-analize so pokazali, da prve tri koordinate pojasnijo skupno 75,5 % genetske variabilnosti, pri čemer genotipi vrste *S. arvensis* predstavljajo svojo skupino, genotipi vrste *B. rapa* pa pripadajo skupini SKS-jev vrste *B. napus* (rezultati niso prikazani).

4.1.9 Prostorsko vrednotenje spontanin intra- in interspeciesnih križanj vrste *B. napus* in njenih spolno kompatibilnih sorodnikov znotraj družine Brassicaceae v štiriletnem časovnem obdobju po statističnih regijah v Sloveniji

V analizo spontanin križanj vrste *B. napus* in njenih SKS-jev znotraj družine Brassicaceae v Sloveniji smo vključili genotipe vseh pojavnih oblik vrste *B. napus* ter obe vrsti njenih SKS-jev, ki so se v štiriletnem časovnem obdobju oziroma v posameznem letu pojavljali v slovenskem pridelovalnem prostoru. Vključene genotipe iz različnih habitatov znotraj slovenskih statističnih regij smo genetsko obravnavali z uporabo 45 markerjev.

Izmed vseh mikrosatelitnih markerjev se je kot najbolj informativen za genetsko identifikacijo intra- in interspeciesnih križanj vrste *B. napus* znotraj družine Brassicaceae izkazal lokus Ni4-D09, izoliran iz vrste *B. nigra*, saj je bila zanj izračunana PIC-vrednost 0,899. Sicer pa je povprečna PIC-vrednost na vseh 45 lokusih znašala 0,705, kar nakazuje na visoko zmožnost razločevanja med obravnavanimi genotipi z izbranim setom mikrosatelitnih markerjev. Povprečna pričakovana heterozigotnost na vseh lokusih je znašala 0,728 in je bila višja od dejanske heterozigotnosti ($H_o = 0,650$). V analizi smo v povprečju na posameznem lokusu določili 18,7 alela ob 94,4-odstotnem deležu polimorfnihih lokusov. Populacijska statistika vrst *B. napus*, *B. rapa* in *S. arvensis*, ki imajo potencial spontanin oprasitev v naravi po statističnih regijah v posameznem letu, je prikazana na sliki 30. Iz Shannonovega informacijskega indeksa na sliki 30 je razvidno, da smo genetsko najbolj raznolike populacije našli v osrednjelovenski regiji v letu 2008, kjer smo izračunali tudi najvišje vrednosti različnih ($N = 10,133$), privatnih ($N_p = 0,422$) in efektivnih ($N_e = 4,904$) alelov.



Slika 30: Alelni vzorci znotraj vrst *B. napus*, *B. rapa* in *S. arvensis* v naravi za posamezno leto znotraj statističnih regij v Sloveniji

Figure 30: Allelic patterns within species of *B. napus*, *B. rapa* and *S. arvensis* in nature for each year inside statistical regions in Slovenia

Povprečna vrednost fiksacijskega indeksa v vseh štirih letih za celotno Slovenijo je $-0,063$. Ta vrednost je sicer negativna, vendar zelo blizu vrednosti 0, kar nakazuje, da je med obravnavanimi genotipi prihajalo do naključnih oprasitev. Na podlagi izračunov fiksacijskih indeksov v posameznem letu za posamezno regijo pa so bila ta križanja najbolj zastopana v letu 2008, in sicer v savinjski ($F = 0,151$) in osrednjelovenski ($F = 0,135$) regiji. Obseg spontanin oprasitev je bil nekoliko manjši ($0,000 < F < 0,099$) znotraj JVS8, OSR10, GOR8, JVS10, JVS9, POD10, OSR9 in POD9. Znotraj ostalih regij in let pa je bil $F < 0$. Skladno s temi rezultati je bila izračunana tudi stopnja tujeprašnosti v naravi med obravnavanimi genotipi znotraj regije v posameznem letu. Število migrantov za vse analizirane genotipe je bilo najvišje na lokusu Ra2-A01 ($N_m = 2,934$), najnižje pa na lokusu Ra2-A10 ($N_m = 0,099$). Število migrantov na regijskem nivoju je bilo daleč najvišje ($N_m = 16,623$) med gorenjsko in osrednjelovensko regijo v letu 2008, ki sta si

tudi geografsko zelo blizu. V povprečju je bila izračunana vrednost prenosa novih alelov prek pretoka genov med slovenskimi statističnimi regijami v štirih letih 2,637. Povprečna frekvenca privatnih alelov v celotnem obdobju za celotno Slovenijo je znašala 0,285, medtem ko je bila povprečna vrednost prenosa genov (m) v Sloveniji, neodvisno od števila genotipov v posamezni regiji, po metodi privatnih alelov 0,524. Vrednosti F_{st} , izračunane na podlagi genetskih primerjav genotipov znotraj posamezne regije za določeno leto, so pokazale, da so med tistimi regijami, kjer je pretok genov najvišji, tudi najmanjše razlike v genetski strukturi genotipov. Tako je bila vrednost F_{st} , ki je merilo genetske različnosti genotipov med dvema regijama, najnižja med gorenjsko in osrednjeslovensko regijo v letu 2008 ($F_{st} = 0,015$). Najvišje vrednosti prenosa genov smo izračunali med posameznimi regijami v istem letu. Da so se znotraj nekaterih regij aleli v populacijah tudi do neke mere ustalili, pa pričajo visoke vrednosti N_m znotraj gorenjske regije med letoma 2007 in 2008 ($N_m = 6,270$) ter med osrednjeslovensko in gorenjsko regijo v letih 2007 in 2008 ($N_m = 6,211$).

Linearizirane parne genetske primerjave (po Slatkinu, 1995) med genotipi znotraj posameznih regij za posamezno leto, izračunane na podlagi F - in R -statistike, so v Mantelovem testu skladnosti obeh matrik podale vrednost $r_{xy} = 0,681$ ($p = 0,01$). Relativno visoka vrednost nam pove, da sta si enakost/različnost alelov (F -statistika) ter varianca v dolžinah alelov (R -statistika) med genotipi posameznih regij v štirih letih precej podobni, ampak je vseeno treba dopustiti možnost prisotnosti mutacij, ki se vzpostavljajo oziroma ohranjajo v naravnih populacijah skozi generacije. Prav zato prihaja tudi do odstopanj med rezultati analize AMOVA na podlagi F - in R -statistike, ki so predstavljeni v preglednici 13.

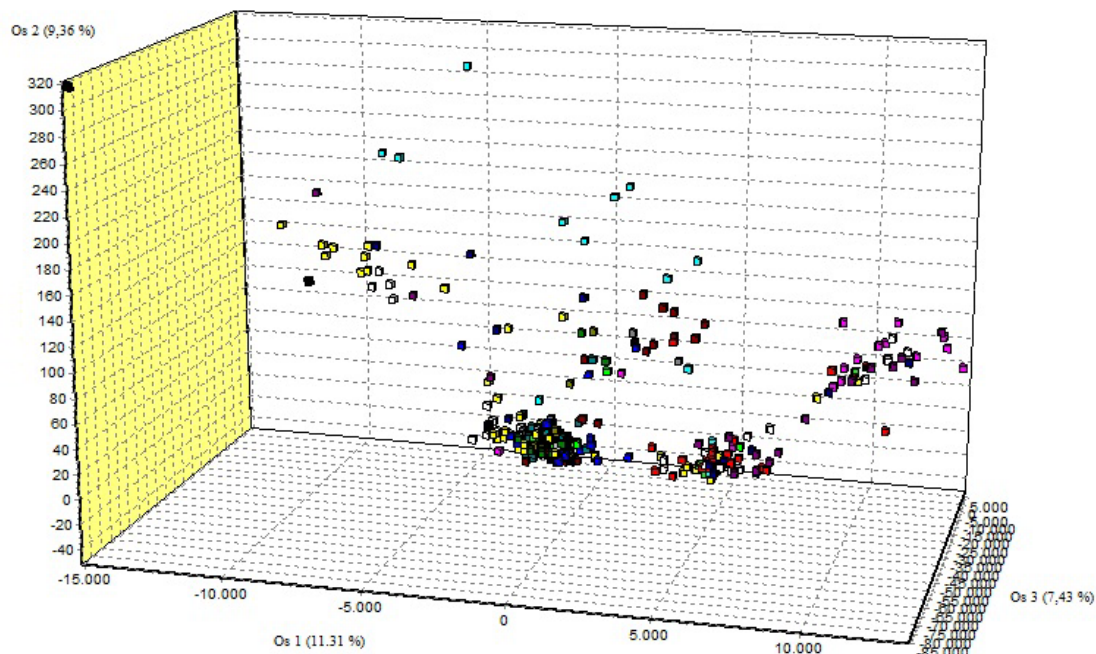
Preglednica 13: Rezultati analize AMOVA na podlagi F - in R -statistike, vključno z indeksi fiksacij glede na vir variabilnosti za genotipe znotraj statističnih regij v Sloveniji za obdobje 2007–2010

Table 13: Results from AMOVA based on F and R statistics including fixation indices according to source of variability for genotypes inside statistical regions in Slovenia in the period from 2007 to 2010

Vir variabilnosti	Stopinje prostosti (df)	Delež variabilnosti (F-statistika) (%)	Indeksi fiksacij ($p = 0,01$)	Delež variabilnosti (R-statistika) (%)	Indeksi fiksacij ($p = 0,01$)
Med regijami	34	6	$F_{st} =$	10	$R_{st} =$
Med genotipi	271	14	0,056	85	0,100
znotraj regij			$F_{is} =$		$R_{is} =$
Znotraj genotipov	306	80	0,151	5	0,944
			$F_{it} =$		$R_{it} =$
Skupaj	611	100	0,199	100	0,950

Iz preglednice 13 je razvidno, da so si v splošnem genotipi znotraj različnih regij v tem časovnem obdobju genetsko zelo podobni (6- oziroma 10-odstotni delež variabilnosti ter nizki vrednosti F_{st} in R_{st}) in da so vsi v vseh regijah ter vseh letih enako zastopani. Iz tega razloga tudi ni za pričakovati visoke genetske in prostorske povezanosti med vsemi pojavnimi oblikami vrst *B. napus*, *B. rapa* in *S. arvensis* v naravnih habitatih. To smo potrdili tudi z Mantelovim testom skladnosti, kjer je koeficient r_{xy} znašal $-0,072$ ($p = 0,01$), in testom parnih primerjav za oceno LRM, kjer je bila povprečna vrednost za vse obravnavane genotipe $-0,003$.

Vse obravnavane genotipe smo na podlagi štirih dejavnikov v FCA-analizi razporedili kot kaže slika 31. Prve tri osi te analize skupno pojasnijo 28,1-odstotni delež genetske variabilnosti.



Slika 31: Razporeditev pojavnih oblik vrst *B. napus*, *B. rapa* in *S. arvensis* v FCA-analizi glede na statistično regijo v posameznem letu (različne barve) v naravnih habitatih znotraj Slovenije

Figure 31: Exploration of appearance forms of *B. napus*, *B. rapa* and *S. arvensis* in FCA according to statistical region in each year (different colours) in natural habitats inside Slovenia

4.1.10 Časovna opredelitev ocene prenosa genov med pojavnimi oblikami vrste *B. napus* in vsemi referenčnimi genotipi (vrste *B. napus* in njenih spolno kompatibilnih sorodnikov) v Sloveniji

Parametre, ki odražajo spremembe v alelni strukturi ter so povezani s pretokom genov v naravi in z njihovo ustalovitvijo v naravnih populacijah vrste *B. napus* v Sloveniji, smo izračunali na podlagi genetske analize z uporabo 45 markerjev, vanjo pa smo vključili tudi referenčne sorte vrste *B. napus*. Poleg tega smo v analizo vključili tudi referenčne genotipe SKS-jev, ki prav tako lahko sodelujejo pri prenosu genov v naravi; njihove genetske profile smo analizirali z uporabo 15 markerjev. Ker smo želeli časovno opredeliti tudi spremembe v alelni strukturi vseh pojavnih oblik vrste *B. napus*, smo na nivoju 45 lokusov analizirali vse genotipe vrste *B. napus*, ki smo jih po posameznih letih zbrali na območju celotne Slovenije.

Na podlagi vseh analiziranih lokusov smo izračunali parametre (preglednica 14), ki vrednotijo spremembe v alelni strukturi, in s tem prenos genov med vključenimi genotipi po posameznih letih. Glede na to, da smo v to analizo vključili tudi referenčne genotipe, s katerimi so se v naravi vzorčeni genotipi vrste *B. napus* sposobni oprašiti, je za pričakovati, da se s stališča prenosa genov vsako leto dogajajo podobne opraševalne relacije. Iz preglednice 14 zato ne moremo izluščiti trenda, ki bi nakazoval na kakršno koli usmerjeno selekcijo in ustalitev prenesenih genov v naravne populacije, če bi, na primer,

primerjali leti 2007 in 2010. Lahko pa rečemo, da so si vrednosti glede na vse obravnavane parametre blizu in da so bolj ali manj vsi zastopani referenčni genotipi podobno vključeni v opraševalne relacije v posameznem letu. Število migrantov (m), ki odraža stopnjo prenosa genov, je bilo najvišje v letih 2008 in 2010, kar potrjujeta tudi najvišji vrednosti števila privatnih alelov (N_p) v teh dveh letih.

Preglednica 14: Parametri za vrednotenje prenosa genov med pojavnimi oblikami vrste *B. napus* in referenčnimi sortami vrste *B. napus* ter njenimi SKS-ji po posameznih letih vzorčenja v Sloveniji

Table 14: Parameters for gene flow evaluation between appeared forms of *B. napus*, reference varieties of *B. napus* and its SKR for each year of sampling in Slovenia

Parameter	2007	2008	2009	2010
% polimorfnih lokusov	76,19	75,62	75,86	75,86
Na – št. različnih alelov	2,498	2,440	2,493	2,517
Ne – št. efektivnih alelov	2,079	2,044	2,057	2,074
N_p – št. privatnih alelov	0,067	0,989	0,522	0,767
I – Shannonov informacijski indeks	0,734	0,719	0,726	0,730
Ho – dejanska heterozigotnost	0,607	0,607	0,605	0,606
He – pričakovana heterozigotnost	0,434	0,428	0,43	0,431
F – fiksacijski indeks	-0,412	-0,428	-0,418	-0,418
t – stopnja tujeprašnosti	2,404	2,495	2,437	2,436
Povprečna frekvenca privatnih alelov	0,191	0,161	0,182	0,167
m – št. migrantov	0,987	1,322	1,010	1,110

Da pa prihaja do ustalitve prenesenih genov v naravne populacije prek spontanega oprašitve skozi čas, pričajo rezultati analize AMOVA, kjer se ob vseskozi enakih referenčnih genotipih molekulska variabilnost med genotipi znotraj pojavnih oblik vrste *B. napus* v naravi veča (preglednica 15; vrednosti od 1,64 v letu 2007 do 6,1 v letu 2010).

Preglednica 15: Časovna opredelitev rezultatov analize AMOVA, v katero so vključeni tudi vsi referenčni genotipi

Table 15: Temporal determination of results from molecular variability analysis, where all reference genotypes are also included

Vir variabilnosti/leto	2007	2008	2009	2010
Med sortami/posevki/samosevci/podivjanimi pop.	41,68	41,35	41,51	38,67
Med genotipi znotraj sort/posevkov/samosevcev/podivjanih pop.	1,64	1,78	2,77	6,1
Znotraj genotipov	56,68	56,87	55,71	55,23

Glede na genetski izvor in rezultate PCoA-analize (rezultati niso prikazani) smo vse vključene genotipe razvrstili v dve skupini, pri čemer je prva skupina sestavljala vse genotipe referenčnih sort vrste *B. napus* subsp. *napus* (razen sort 'Bienvenue' in 'Viva') in vse pojavnne oblike vrste *B. napus* v naravi v posameznem letu. Drugo skupino pa so sestavljali genotipi sort 'Bienvenue' in 'Viva', genotipi vrste *B. napus* subsp. *napobrassica* ter vsi genotipi referenčnih SKS-jev. Glede na to razdelitev smo obe skupini vključili v analizo AMOVA za posamezno leto in dobili rezultate, ki so prikazani v preglednici 16. Tudi pri tej razporeditvi se kaže trend povečane molekulske variabilnosti med genotipi znotraj pojavnih oblik vrste *B. napus* v naravi skozi čas (negativno označene vrednosti v

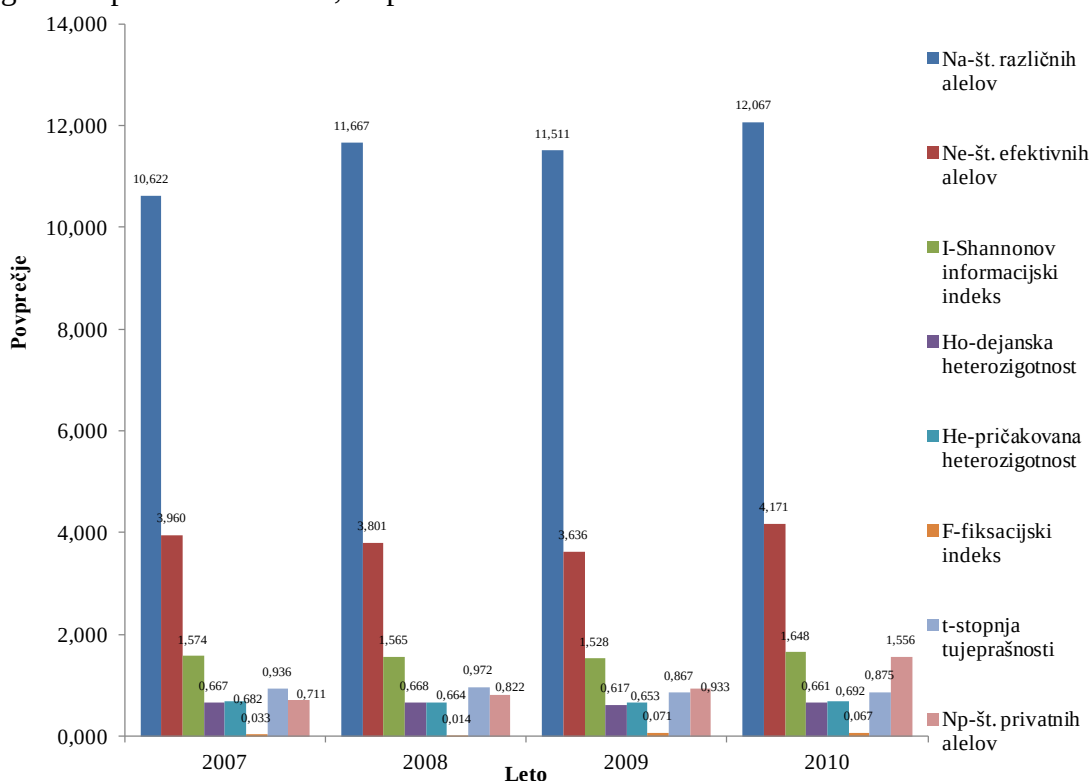
obdobju 2007–2010 postajajo vedno manj negativne, čeprav je med letoma 2008 in 2009 minimalna razlika v nasprotni smeri).

Preglednica 16: Časovna opredelitev rezultatov analize AMOVA na podlagi predhodne razdelitve v skupine, v katere so vključeni tudi vsi referenčni genotipi

Table 16: Temporal determination of results from molecular variability analysis, based on the a prior different groups, where all reference genotypes are also included

Vir variabilnosti/leto	2007	2008	2009	2010
Med skupinama	41,32	40,73	41,06	37,99
Med sortami/posevki/samosevci/podivjanimi pop. znotraj skupine	7,71	7,73	6,73	7,73
Med genotipi znotraj sort/posevkov/samosevcev/podivjanih pop.	-5,78	-5,34	-3,52	-0,93
Znotraj genotipov	56,75	56,88	55,73	55,20

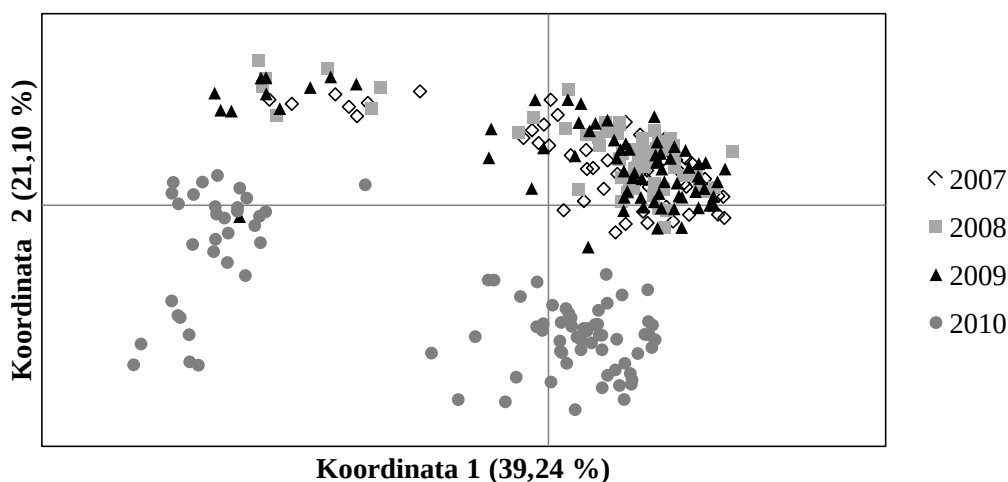
V analizi časovne opredelitve intra- in interspeciesnega prenosa genov med vsemi pojavnimi oblikami vrste *B. napus* v naravi po posameznih letih (brez vključenih referenčnih genotipov) smo izračunali povprečni fiksacijski indeks za vsa štiri leta ($F = 0,046$), stopnjo tujeprašnosti ($t = 0,912$) in povprečno število migrantov na vseh 45 lokusih ($N_m = 14,31$ ob 100-odstotnem deležu polimorfnihih lokusov). Parametri, ki odražajo prenos genov v posameznem letu, so prikazani na sliki 32.



Slika 32: Alelni vzorci vseh pojavnih oblik vrste *B. napus* v naravi v posameznem letu na območju Slovenije
Figure 32: Allelic patterns of all appeared forms of *B. napus* in nature in each year on the Slovenian territory

Parametri iz slike 32 potrjujejo tudi ugotovitve iz preglednice 15, da je v vsakem letu prihajalo do spontanhih oprašitev in da so razlike v posameznih letih glede stopnje tujeprašnosti majhne. Glede na vrednosti fiksacijskih indeksov (za vsa leta so bile izračunane pozitivne vrednosti), ki predstavljajo oceno stopnje spontanhih oprašitev, je bilo

teh največ v letih 2009 in 2010, najmanj oziroma najbolj usmerjene oprašitve pa so se dogajale v letih 2008 in 2007, kar je lahko posledica vremenskih razmer in večje prostorske izolacije med zbranimi genotipi v naravi. Genetska raznolikost pojavnih oblik vrste *B. napus* v naravi se med leti ni bistveno spreminjala, najvišja pa je bila v letu 2010 ($I = 1,648$). V tem letu smo izračunali tudi najvišje število privatnih alelov, ki je naraščalo iz leta v leto. Ta trend pa odraža oceno ustalitve novih genov prek spontanega oprašitve v samoohranjene populacije vrste *B. napus* skozi čas.



Slika 33: Časovna razporeditev genotipov vseh pojavnih oblik vrste *B. napus* v naravnih habitatih Slovenije glede na rezultate PCoA-analize

Figure 33: Temporal disposal of genotypes of all appeared forms of *B. napus* in natural habitats of Slovenia according to PCoA results

Da pa so genotipi pojavnih oblik vrste *B. napus* v Sloveniji iz leta v leto genetsko manj povezani in da se zaradi spontanega oprašitve v naravi vedno bolj razlikujejo zaradi vnosa novih genov, lahko razberemo iz slike 33. Rezultati PCoA-analize so namreč pokazali genetsko cepitev med genotipi znotraj posameznega leta, ki je iz leta v leto opaznejša in tako najbolj očitna v letu 2010. Največje število migrantov kot merila prenosa genov smo izračunali med letoma 2007 in 2008, pri čemer je bila tudi vrednost F_{st} , ki je merilo genetske razliknosti pojavnih oblik vrste *B. napus*, med tema dvema letoma najnižja (preglednica 17). Poleg tega se vrednost F_{st} interpretira tudi kot mera ohranitve in ustalitve genov, ki je glede na naše izračune najvišja med letoma 2007 in 2010, kar pomeni, da je prišlo do ustalitve prenesenih genov (prek spontanega oprašitve v naravi) v tem obdobju.

Preglednica 17: Ocena prenosa genov (število migrantov – N_m) in njihove ustalitve (oprašitveni koeficient – F_{st}) prek spontanega križanja med posameznimi leti v Sloveniji

Table 17: Estimation of gene flow (number of migrants- N_m) and its conservation (inbreeding coefficient- F_{st}) via spontaneous hybridizations among different years in Slovenia

Leto 1	Leto 2	F_{st}	N_m
2007	2008	0,011	23,369
2007	2009	0,021	11,782
2008	2009	0,013	19,572
2007	2010	0,044	5,478
2008	2010	0,041	5,891
2009	2010	0,032	7,458

4.2 PRIMERJAVA PRIKAZA IN OBDELAVE REZULTATOV NA DIPLOIDNEM IN TETRAPLOIDNEM NIVOJU

V tej točki so predstavljeni rezultati celotne analize vseh 498 genotipov vrste *B. napus* in njenih SKS-jev, tako referenčnih kot tistih, zbranih na terenu, na osnovi 45 oziroma 15 lokusov. Analiza genetske raznolikosti vrste *B. napus* in njenih SKS-jev v Sloveniji je sestavljena iz treh delov. Prvi del zajema rezultate celotne analize genetske raznolikosti na 2n-nivoju, pri čemer smo kot vhodni podatek uporabili kodominantno matriko alelnih dolžin dveh alelov na vsakem lokusu. Drugi del vključuje rezultate analize genetske raznolikosti, pri čemer smo kot vhodni podatek uporabili kodominantno matriko alelnih dolžin štirih alelov na vsakem lokusu (za računalniški program Structure 2.3.3) (Pitchard in sod., 2009) in binarno matriko na osnovi prisotnosti 1–4 alelov na posameznem lokusu, kot je že opisano v točki 3.2.1.2 (za računalniške programe GenAlEx, FreeTree in TreeView). Tretji del pa predstavlja primerjave rezultatov prvega in drugega dela analize.

4.2.1 Analiza genetske raznolikosti vseh obravnavanih genotipov na diploidnem nivoju

Na podlagi zmnožka PI-vrednosti na vseh 45 lokusih, ki je znašal $3,89 \times 10^{-51}$, smo ugotovili, da je izbrani set mikrosatelitnih markerjev glede na tako nizko vrednost ustrezen za proučevanje genetske raznolikosti vrste *B. napus* in njenih SKS-jev iz družine Brassicaceae v slovenskem pridelovalnem prostoru. Ostali parametri genetske variabilnosti, vrednosti fiksacijskih indeksov in vrednosti ocene prenosa genov (število migrantov) za posamezen lokus so predstavljeni v preglednici 18.

Preglednica 18: Parametri variabilnosti po posameznih lokusih, vrednosti fiksacijskih indeksov in število migrantov na posameznem lokusu

Število alelov (N), razpon dolžin alelov (Ra), pričakovana heterozigotnost (He), obravnavana heterozigotnost (Ho) in informacijska vrednost polimorfizma (PIC), vrednosti Fis, Fit in Fst ter število migrantov (Nm).

Table 18: The parameters of variability for each locus, values of fixation indices and number of migrants on each locus

Number of aleles (N), range of allele lengths (Ra), expected heterozygosity (He), observed heterozygosity (Ho), and polymorphic information content (PIC), Fis, Fit in Fst and number of migrants (Nm).

Lokus	N	Ra (bp)	He	Ho	PIC	Fis	Fit	Fst	Nm
Na12-A07	23	114-222	0,646	0,535	0,625	-0,342	0,048	0,291	0,610
Na12-B05	27	135-221	0,860	0,821	0,845	-0,435	0,153	0,410	0,360
Na12-C08	23	255-349	0,778	0,505	0,766	-0,136	0,365	0,441	0,317
Na12-E05	21	102-176	0,746	0,899	0,726	-0,446	0,015	0,319	0,534
Na12-G05	22	144-254	0,880	0,785	0,867	-0,327	0,205	0,401	0,373
Na14-E11	20	108-188	0,713	0,876	0,669	-0,567	-0,067	0,319	0,534
Na14-G02	17	139-215	0,780	0,686	0,753	-0,294	0,288	0,449	0,306
Ni3-G04b	23	97-171	0,668	0,746	0,616	-0,579	-0,237	0,217	0,903
Ni4-D09	25	124-246	0,889	0,904	0,879	-0,400	-0,054	0,247	0,761
Ni4-E08	12	105-195	0,310	0,305	0,295	-0,080	0,670	0,695	0,110
Na12-A08	17	137-205	0,772	0,491	0,746	-0,282	0,336	0,482	0,269
Na12-E06a	12	162-252	0,797	0,717	0,773	-0,460	0,201	0,453	0,302
Na12-C06	29	153-297	0,905	0,785	0,897	-0,295	0,203	0,385	0,400
Na10-A08	29	107-227	0,791	0,740	0,778	-0,327	0,088	0,313	0,549
Na14-H11	17	102-182	0,789	0,961	0,767	-0,434	0,049	0,337	0,491
BN83B1	20	103-272	0,393	0,189	0,386	0,053	0,566	0,542	0,212
MR183	15	76-134	0,748	0,941	0,709	-0,663	-0,061	0,362	0,441
Ni4-G04	12	256-348	0,674	0,498	0,614	-0,345	0,382	0,541	0,212
Ni4-H04	20	116-234	0,863	0,369	0,850	-0,169	0,628	0,681	0,117
Ol10-D03	23	106-198	0,767	0,920	0,740	-0,708	-0,052	0,384	0,401
Ol11-D12	33	111-209	0,932	0,638	0,927	-0,214	0,441	0,539	0,214
Ol11-G11	18	99-197	0,821	0,942	0,800	-0,591	0,009	0,377	0,413
Ol11-H02	15	128-218	0,807	0,700	0,782	-0,199	0,266	0,388	0,395
Ol12-A04	16	120-202	0,507	0,471	0,491	-0,346	0,267	0,455	0,299
Ol12-B05	21	122-244	0,432	0,316	0,418	0,019	0,697	0,691	0,112
Ol12-D05	22	89-193	0,788	0,697	0,763	-0,271	0,088	0,282	0,636
Ol12-D09	14	103-193	0,697	0,907	0,648	-0,748	-0,156	0,339	0,488
Ol12-E03	16	88-157	0,847	0,928	0,828	-0,474	-0,127	0,235	0,812
Ol12-F11	18	124-286	0,710	0,717	0,682	-0,553	0,078	0,406	0,365
Ol13-E08	24	100-266	0,728	0,762	0,688	-0,425	-0,057	0,258	0,719
Ra2-A01	16	88-178	0,695	0,921	0,646	-0,642	-0,362	0,170	1,219
Ra2-A10	16	170-296	0,724	0,223	0,697	0,654	0,981	0,945	0,015
Ra2-E03	22	181-319	0,613	0,317	0,583	0,052	0,608	0,586	0,176
Ra2-E04	24	96-240	0,715	0,920	0,671	-0,541	0,004	0,353	0,457
Ra2-E12	28	99-281	0,798	0,745	0,779	-0,224	0,067	0,238	0,801
Ra2-F11	32	151-307	0,792	0,911	0,768	-0,421	0,045	0,328	0,511

Se nadaljuje.

Nadaljevanje.

Lokus	N	Ra (bp)	He	Ho	PIC	Fis	Fit	Fst	Nm
Ra2-G09	29	156-300	0,690	0,373	0,674	0,116	0,666	0,623	0,151
Ra3-E05	17	183-285	0,681	0,701	0,641	-0,428	0,175	0,422	0,342
Ra3-H10	19	96-202	0,762	0,810	0,746	-0,483	-0,107	0,254	0,735
BRMS-036	19	96-178	0,814	0,957	0,791	-0,597	-0,005	0,371	0,425
BRMS0-50	25	105-251	0,428	0,297	0,415	-0,113	0,316	0,385	0,399
MR187	25	101-214	0,618	0,400	0,605	-0,009	0,373	0,378	0,411
RES1	18	104-199	0,846	0,909	0,826	-0,375	0,107	0,350	0,464
RES6	10	148-223	0,331	0,192	0,319	0,084	0,884	0,873	0,036
BN6A2	13	93-169	0,623	0,424	0,585	0,097	0,515	0,463	0,290
Skupaj	917								
Povprečje	20,4		0,715	0,663	0,690	-0,308	0,211	0,422	0,424

Na podlagi najvišje PIC-vrednosti, ki so prikazane v preglednici 18, se je kot najbolj informativen izkazal mikrosatelitni lokus Ol11-D12, ki izvira iz vrste *B. oleracea* in je dosegel vrednost 0,927, medtem ko je povprečna PIC-vrednost v analizi za vse lokuse znašala 0,69. Skupna povprečna pričakovana heterozigotnost na vseh lokusih je znašala 0,715, kar predstavlja genetsko raznolikost obravnavanega genskega sklada znotraj družine Brassicaceae in je višja od povprečne dejanske heterozigotnosti ($H_o = 0,663$). Odstopanje med tema dvema vrednostma odraža dejansko stanje v spremembi populacijske dinamike glede na genetsko strukturo, kar potrjuje tudi povprečna negativna vrednost F_{is} ($-0,308$), ki odraža zmanjšanje heterozigotnosti genotipov prek usmerjenih oprašitev znotraj populacij. Oprašitveni koeficient (F_{st}) v povprečju znaša 0,422 in predstavlja stopnjo genetske diferenciacije med genotipi na podlagi 45 lokusov. Povprečno število migrantov oziroma stopnja prenosa genov na obravnavanih lokusih je znašala 0,424, najvišjo pa smo določili na lokusu Ra2-A01 ($N_m = 1,219$), ki izvira iz vrste *B. rapa*. V celotni analizi smo določili 917 različnih alelov, v povprečju 20,4 alela na posameznem lokusu (preglednica 18) ob 76,6-odstotnem deležu polimorfnihih lokusov.

Povprečno število različnih alelov s frekvenco več kot 5 % v analizi na vseh lokusih je bilo 2,922. Povprečno število lokalno skupnih alelov, ki se v analizi s frekvenco več kot 5 % pojavljajo v 25 ali manj % populacij (referenčnih sortah vrste *B. napus* in SKS-jih, pojavnih oblikah vrste *B. napus*, *B. rapa* in *S. arvensis* v naravi), je bilo 3,567, medtem ko je povprečno število lokalno skupnih alelov, ki se v analizi s frekvenco več kot 5 % pojavljajo v 50 ali manj % populacij (referenčnih sortah vrste *B. napus* in SKS-jih, pojavnih oblikah vrste *B. napus*, *B. rapa* in *S. arvensis* v naravi), znašalo 4,244. Vrednost Shannonovega informacijskega indeksa genetske raznolikosti genskega sklada obravnavanih genotipov znotraj družine Brassicaceae je bila 0,761, povprečno število efektivnih alelov je imelo vrednost 2,153, povprečno število privatnih alelov pa 0,411. Povprečen fiksacijski indeks na vseh lokusih v analizi je dosegel vrednost $F = -0,391$, stopnja tujeprašnosti pa 2,282. Negativna vrednost fiksacijskega indeksa in posledično visoka vrednost stopnje tujeprašnosti nakazujeta na presežek heterozigotov prek negativno usmerjenih oprašitev oziroma heterotične selekcije na račun prisotnosti referenčnih genotipov vrste *B. napus* in njenih SKS-jev v analizi, za katere smo med drugim izračunali, da so na vseh analiziranih lokusih znotraj vrednosti HWE ($p < 0,05$).

Analiza AMOVA je na podlagi vrednosti Φ pokazala, da genetska variabilnost znotraj populacij (referenčnih sort vrste *B. napus* in SKS-jev, pojavnih oblik vrst *B. napus*, *B. rapa* in *S. arvensis* v naravi) znaša 76 %, med njimi pa 24 %. Analiza AMOVA, izračunana na osnovi predhodne razvrstitve obravnavanih genotipov v 16 skupin (samosevne populacije, posevki, podivjane populacije, genotipi vrste *B. rapa* s terena, genotipi vrste *S. arvensis* s terena, referenčni genotipi sort vrste *B. napus* subsp. *napus*, referenčna genotipa vrste *B. napus* subsp. *napobrassica* ter 9 skupin referenčnih genotipov različnih vrst SKS-jev), je pokazala razporeditev molekulske variabilnosti, kar je prikazano v preglednici 19, kjer so populacije obravnavane kot referenčne sorte vrste *B. napus* in SKS-jev, pojavne oblike vrst *B. napus*, *B. rapa* in *S. arvensis* v naravi. Delež molekulske variabilnosti med skupinami je znašal 3,22 %, med populacijami znotraj skupin 11,79 %, med genotipi znotraj populacij 6,89 % in znotraj genotipov v analizi 78,10 % (preglednica 19). Vrednosti fiksacijskih indeksov v analizi AMOVA so bile vse pozitivne, in sicer: $F_{is} = 0,081$, $F_{sc} = 0,121$, $F_{ct} = 0,032$ in $F_{it} = 0,219$. Izmed teh je bila najnižja vrednost F_{ct} , ki predstavlja najnižje odstopanje od vrednosti HWE med genotipi populacij znotraj skupin, kar dokazuje, da je bila izbira 16 skupin glede na genetski izvor vključenih genotipov ustrezna.

Preglednica 19: Rezultati analize AMOVA na podlagi predhodno razvrščenih populacij v skupine glede na njihov izvor

Table 19: Results of AMOVA based on preliminary arrangement of the populations according to their origin

Vir variabilnosti	Stopinje prostosti	Vsota kvadratov	Komponente variance	% variabilnosti
Med skupinami	15	1629,836	0,55754	3,22
Med populacijami znotraj skupin	56	1568,649	2,04112	11,79
Med genotipi znotraj populacij	426	6777,951	1,19329	6,89
Znotraj genotipov	498	6735,000	13,52410	78,10
Skupaj	995	16711,436	17,31605	100,00

Prve tri koordinate v PCoA-analizi skupno pojasnijo 76,74 % genetske variabilnosti, od tega prva komponenta 46,13 %, druga 17,98 % in tretja 12,63 %. Glede na rezultate klastrske analize, opravljene na podlagi Bayesovega pristopa, smo izračunali sedem »realnih« genetskih skupin, pri čemer je vrednost $\ln P(D)$ znašala -68622,6, povprečna vrednost alfa pa 0,0393. Pričakovane heterozigotnosti oziroma povprečne genetske razdalje in vrednosti F_{st} znotraj posamezne genetske skupine (klastra) so prikazane v preglednici 20. Vse genetske skupine so glede na vrednosti H_e dokaj izenačene, razen četrte genetske skupine ($H_e = 0,293$), kjer je genetska raznolikost najnižja in so si zato v tej skupini genotipi najbolj sorodni, kar dokazuje tudi najvišji oprašitveni koeficient znotraj te genetske skupine ($F_{st} = 0,439$).

Preglednica 20: Povprečne vrednosti genetskih razdalj in oprašitvenih koeficientov znotraj genetskih skupin, izračunane na podlagi Bayesovega pristopa v klasterski analizi

Table 20: Mean values of genetic distances and inbreeding coefficients within genetic clusters calculated by using Bayesian approach in cluster analysis

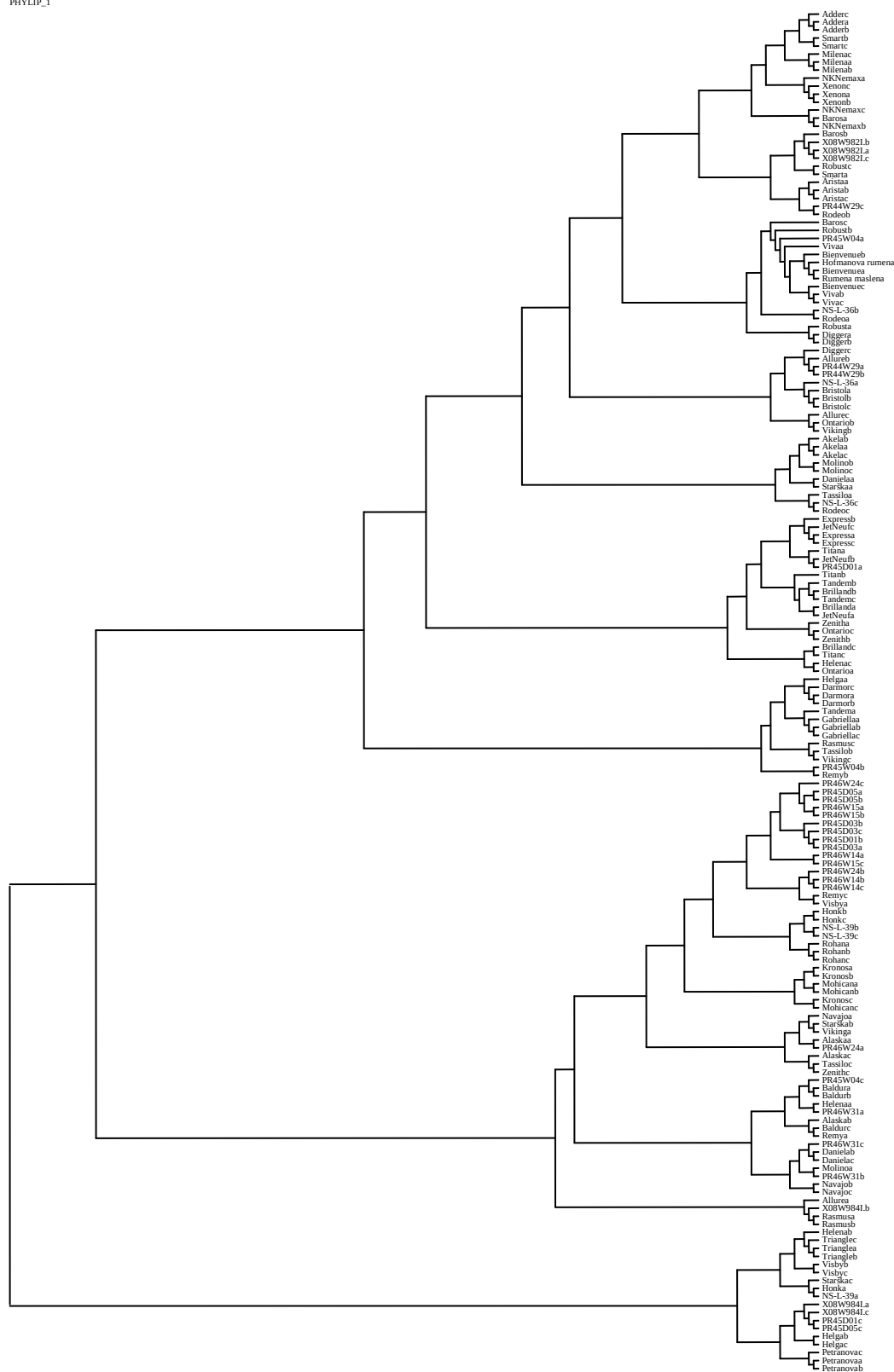
Skupina	He	Fst
Genetska skupina 1	0,773	0,094
Genetska skupina 2	0,745	0,144
Genetska skupina 3	0,618	0,159
Genetska skupina 4	0,293	0,439
Genetska skupina 5	0,658	0,173
Genetska skupina 6	0,659	0,170
Genetska skupina 7	0,603	0,256
Povprečje	0,621	0,205

V celotni analizi je bila najvišja stopnja prenosa genov na podlagi števila migrantov ($N_m = 57,491$, $p = 0,03$) izračunana med samosevnimi in podivjanimi populacijami vrste *B. napus*, ki smo jih v štiriletnem časovnem obdobju zbrali na območju celotne Slovenije.

4.2.2 Analiza genetske raznolikosti vseh obravnavanih genotipov na tetraploidnem nivoju

Rezultati celotne analize genetske raznolikosti vrste *B. napus* in njenih SKS-jev v slovenskem pridelovalnem prostoru na 4n-nivoju so bili pridobljeni na podlagi binarne vhodne matrike, kjer je bila prisotnost vsakega od štirih alelov označena z 1, odsotnost pa z 0. Tako smo izračunali, da je bila vrednost števila učinkovitih alelov (N_e) v analizi 1,115, povprečna pričakovana heterozigotnost (H_e) 0,169 in povprečni Shannonov informacijski indeks genetske raznolikosti (I) 0,100. V celotni analizi smo izračunali le 18,32-odstotni delež polimorfnih lokusov. Povprečno število prog s frekvenco več kot 5 % v analizi je bilo 104,5. Povprečno število lokalno skupnih prog, ki se v analizi s frekvenco več kot 5 % pojavljajo v 25 ali manj % populacij (referenčnih sortah vrste *B. napus* in SKS-jih, pojavnih oblikah vrst *B. napus*, *B. rapa* in *S. arvensis* v naravi), je bilo 14, medtem ko je povprečno število lokalno skupnih prog, ki se v analizi s frekvenco več kot 5 % pojavljajo v 50 ali manj % populacij (referenčnih sortah vrste *B. napus* in SKS-jih, pojavnih oblikah vrst *B. napus*, *B. rapa* in *S. arvensis* v naravi), znašalo 29. Analiza AMOVA je na podlagi vrednosti ϕ pokazala, da genetska variabilnost znotraj populacij (referenčnih sort vrste *B. napus* in SKS-jev, pojavnih oblik vrst *B. napus*, *B. rapa* in *S. arvensis* v naravi) znaša 72 %, med njimi pa 28 %. Izračunali smo tudi, da prve tri koordinate v PCoA-analizi skupno pojasnijo 78,45 % genetske variabilnosti, od tega prva komponenta 53, 33 %, druga 14,05 % in tretja 11,07 %. Genetske povezave vseh referenčnih genotipov vrste *B. napus* v analizi, opravljeni na podlagi Neijeve standardne genetske razdalje (Nei, 1987) in NJ-metode združevanja, so prikazane na filogenetskem drevesu na sliki 34. Glede na to, da smo drevo izrisali na podlagi binarne vhodne matrike, ki je pripravljena na 4n-nivoju, in da se genotipi referenčnih sort v večini obnašajo kot diploidi, je vidna relativno dobra izenačenost genotipov znotraj referenčnih sort, predvsem nekaterih hibridov ('Xenon', 'X08W982I', 'Rohan' in 'Triangle'), in tudi znotraj posameznih linijskih sort ('Adder', 'Milena', 'Arista', 'Digger', 'Bristol', 'Akela', 'Darmor', 'Gabriella' in 'Petranova'). Izenačenosti znotraj obeh sort podzemne kolerabe nismo izračunali, saj je bila vsaka v analizo vključena z enim genotipom.

PHYLIP_1



Slika 34: Genetske povezave med posameznimi genotipi znotraj referenčnih sort vrste *B. napus* in med njimi, predstavljene na osnovi Ds-matrike in NJ-metode združevanja
Oznake a, b in c ob vsakem imenu sorte označujejo posamezen genotip znotraj nje.

Figure 34: Genetic relationship between different genotypes inside reference varieties of *B. napus* and among them, based on Ds matrix and NJ clustering method

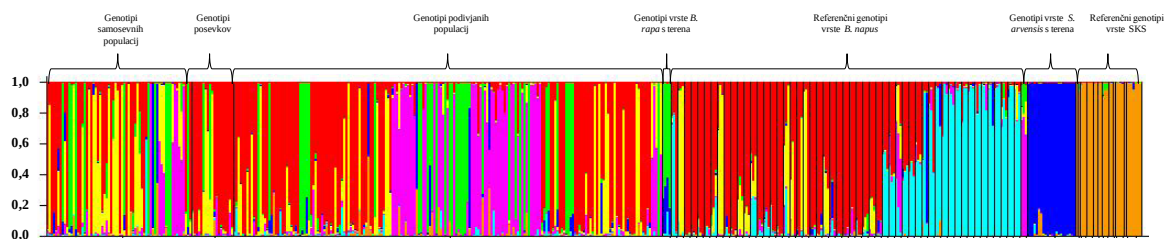
Labels a, b and c beside of each variety name represents different genotype inside variety.

Spodaj predstavljene rezultate klastrske analize, opravljene na podlagi Bayesovega pristopa, smo pridobili z uporabo kodominantne matrike dolžin alelov na 4n-nivoju, kar omogoča računalniški program Structure 2.3.3 (Pitchard in sod., 2009). Izračunali smo sedem »realnih« genetskih skupin, kjer je vrednost $\ln P(D)$ znašala $-144863,5$, povprečna vrednost alfa pa $0,0405$. Pričakovane heterozigotnosti oziroma povprečne genetske razdalje in vrednosti F_{st} znotraj posamezne genetske skupine (klastra) so prikazane v preglednici 21. Vse genetske skupine so bile glede na vrednosti H_e dokaj izenačene, razen ene (sedma genetska skupina), kjer je bila genetska raznolikost najnižja ($H_e = 0,250$) in so si zato v tej skupini genotipi najbolj sorodni, kar dokazuje tudi najvišji oprašitveni koeficient znotraj te genetske skupine ($F_{st} = 0,317$). Ocene aposteriornih verjetnosti, da posamezen genotip pripada določeni genetski skupini (sedem različnih barv), je prikazana na sliki 35.

Preglednica 21: Povprečne vrednosti genetskih razdalj in oprašitvenih koeficientov znotraj genetskih skupin, izračunane z uporabo Bayesovega pristopa v klastrski analizi, opravljeni na podlagi 4n-kodominantne vhodne matrike

Table 21: Mean values of genetic distances and inbreeding coefficients within genetic clusters calculated by using Bayesian approach in cluster analysis based on tetraploid codominant input matrix

Skupina	H_e	F_{st}
Genetska skupina 1	0,707	0,070
Genetska skupina 2	0,735	0,058
Genetska skupina 3	0,655	0,086
Genetska skupina 4	0,727	0,084
Genetska skupina 5	0,697	0,132
Genetska skupina 6	0,747	0,083
Genetska skupina 7	0,250	0,317
Povprečje	0,645	0,119



Slika 35: Genetska struktura vseh genotipov v analizi genetske raznolikosti, predstavljena na podlagi klastrske analize in kodominantne vhodne matrike alelnih dolžin na 4n-nivoju

Figure 35: Genetic structure of all genotypes included in analysis of genetic variability based on cluster analysis and codominant input matrix of allele lengths on 4n level

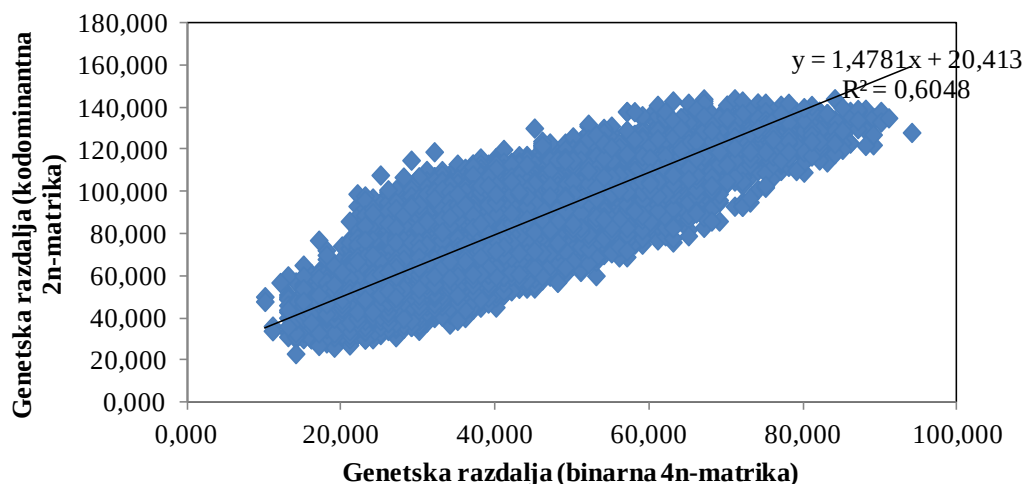
4.2.3 Primerjava rezultatov analiz med diploidnim in tetraploidnim nivojem

Če primerjamo točki 4.2.1 in 4.2.2, lahko ugotovimo, da sta informativnost in obseg informacij na podlagi rezultatov kodominantne matrike na 2n-nivoju iz točke 4.2.1 na višji ravni kot obseg in informativnost, ki sta pridobljena na podlagi binarne matrike na 4n-nivoju. Ob tem je treba poudariti, da so pri obeh nivojih uporabljeni isti surovi podatki, le prebrani so na drugačen način. Razlika je v načinu oblikovanja matrike, ki služi kot vhodni

podatek za računalniške programe, ki statistično obdelajo in prikažejo rezultate genetske analize. Nabor računalniških programov za obdelavo rezultatov v populacijski genetiki je velik, njihova ustreznost pa je odvisna od dotične analize. Dejstvo pa je, da velika večina programov lahko uporablja le vhodne kodominatne matrike 2n-organizmov ali pa binarne vhodne matrike, za katere ploidnost obravnavanega organizma ni ključna. Prav zato tudi obseg razpoložljivih informacij, pridobljenih iz obeh nivojev, ni primerljiv. Primerljive pa so nekatere statistike in parametri, ki jih lahko primerjamo na podlagi izračunanih vrednosti istega računalniškega programa, kjer smo v analizi uporabili različni vhodni matriki.

Če primerjamo stopnji polimorfizma med obravnavanjem na 2n- ($P = 76,60\%$) in 4n-nivoju ($P = 18,32\%$), vidimo, da se velik delež genetske informacije na podlagi iste analize v primeru binarne matrike (4n) izgubi. To je potrdil tudi izračun števila efektivnih alelov v analizi, ki je bil na 2n-nivoju višji ($N_e = 2,153$), na 4n-nivoju pa nižji ($N_e = 1,115$). Populacijskih indeksov (F , t in N_m), ki označujejo stopnje prenosa genov na podlagi binarne matrike (4n), nismo mogli izračunati, zato tak način obdelave ni ustrezen za proučevanje prenosa genov v naravi. Na obeh nivojih pa smo lahko izračunali genetsko raznolikost glede na vrednost Shannonovega informacijskega indeksa obravnavanih genotipov znotraj družine Brassicaceae, ki je bil na 2n-nivoju 0,761 na 4n-nivoju pa 0,1. To odstopanje je predvsem posledica odstopanja med stopnjama polimorfnosti na obeh nivojih. Trend naraščanja povprečnega števila alelov oziroma prog, ki se v analizi s frekvenco več kot 5 % pojavljajo v 25 ali manj % populacij in 50 ali manj % populacij (referenčnih sort vrste *B. napus* in SKS-jev, pojavnih oblik vrst *B. napus*, *B. rapa* in *S. arvensis* v naravi), je viden pri obeh nivojih. Relativno primerljivi so bili rezultati analize AMOVA, ki smo jih v analizah na obeh nivojih izračunali na podlagi vrednosti Φ . Genetska variabilnost znotraj populacij na 2n-nivoju je znašala 76 %, medtem ko na 4n-nivoju 72 %, variabilnost med populacijami pa je na 2n-nivoju znašala 24 %, na 4n-nivoju pa 28 %. Prve tri koordinate v PCoA-analizi na 2n-nivoju skupno pojasnijo 76,74 % genetske variabilnosti, medtem ko prve tri koordinate v PCoA-analizi na 4n-nivoju skupno pojasnijo nekoliko več genetske variabilnosti, to je 78,45 %.

Da bi pridobili dejansko oceno skladnosti kodominatne vhodne matrike na 2n-nivoju in binarne vhodne matrike na 4n-nivoju, smo z Mantelovim testom primerjali skladnost matrik, izdelanih na podlagi parnih genetskih razdalj na obeh nivojih. Koeficient skladnosti matrik (r_{xy}) je na obeh nivojih znašal 0,851 ($p = 0,01$), kar predstavlja dobro povezanost med matrikama, kljub temu pa se glede na celoto pri pretvorbi izgubi 14,9 % genetske informacije. Grafična predstavitev Mantelove primerjave je prikazana na sliki 36.



Slika 36: Rezultat skladnosti binarne 4n-matrike in kodominantne 2n-matrike na podlagi parnih genetskih razdalj, ugotovljenih z Mantelovim testom

Figure 36: Result of uniformity between binary 4n matrix and codominant 2n matrix based on the pairwise genetic distance with Mantel test

Za orientacijo smo po enakem postopku primerjali tudi kodominantno in binarno matriko, obe na 2n-nivoju, pri čemer pa je bil izračunan Mantelov koeficient skladnosti (r_{xy}) 0,794 ($p = 0,01$), kar predstavlja šibko povezanost obeh vhodnih matrik. Glede na to, da vrsta *B. napus* v osnovi genetsko izvira iz 4n-stanja, smo v analizo skladnosti matrik, kot je opisana zgoraj, vključili le referenčne genotipe vrste *B. napus*, in sicer na podlagi parnih genetskih razdalj binarne 4n-matrike in kodominantne 2n-matrike. Izračunali smo, da je $r_{xy} = 0,914$ ($p = 0,01$), kar predstavlja zelo dobro povezanost med matrikama.

Če primerjamo rezultate klastrske analize, opravljene na podlagi kodominantnih matrik na 2n- in 4n-nivoju, ki smo jih izračunali v programu Structure 2.3.3 (Pitchard in sod., 2009), lahko vidimo, da smo v obeh obdelavah z uporabo Bayesovega pristopa izračunali sedem realnih genetskih skupin ter da so vrednosti H_e in F_{st} znotraj genetskih skupin primerljive. Sicer so povprečne vrednosti F_{st} na 4n-nivoju znotraj genetskih skupin nižje, kar kaže na to, da je ocena oprašitvenih relacij na 4n-nivoju natančnejša.

Na podlagi dobljenih in opisanih rezultatov lahko zaključimo, da je analiza genetske raznolikosti vrste *B. napus* in njenih SKS-jev znotraj družine Brassicaceae v slovenskem pridelovalnem prostoru z izbranim setom 45 mikrosatelitnih markerjev najbolj informativna in učinkovita na podlagi obdelave kodominantnih vhodnih matrik na 2n-nivoju, saj za to obstaja tudi veliko možnosti prikaza in obdelave rezultatov populacijske genetike prek računalniških programov. Ob možnosti, ki bi dopuščala analogne obdelave na 4n-nivoju, pa bi z vhodnimi kodominantnimi matrikami vsekakor pridobili še boljšo in podrobnejšo genetsko sliko.

4.3 ANALIZA PRISOTNOSTI GENSKO SPREMENJENIH ORGANIZMOV VRSTE *B. napus* V SLOVENIJI

Skupno smo v analizo prisotnosti gensko spremenjenih organizmov vrste *B. napus* v Sloveniji vključili 158 vzorcev. Od tega je bilo 89 vzorcev samosevnih in podivjanih

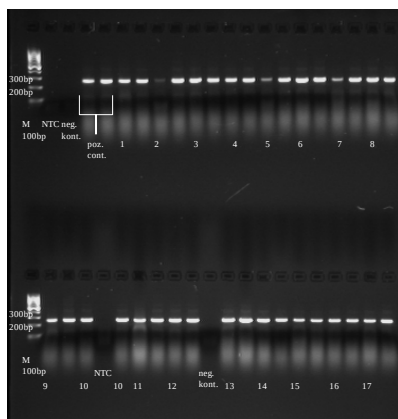
populacij vrste *B. napus* z območja celotne Slovenije, nabranih v letih 2007 in 2008 (lokacije so predstavljene v prilogi H), in 69 vzorcev semena oljne ogrščice, ki se je v rastni sezoni 2007/2008 pridelalo v Sloveniji.

4.3.1 Kvalitativna PCR-analiza za določitev gensko spremenjenih organizmov vrste *B. napus*

Rezultati kvalitativne PCR-analize za določitev gensko spremenjenih organizmov vrste *B. napus* na štirih presejalnih genskih elementih (bar, EPSPS, p35S in tNOS) so bili za vse analizirane združene vzorce negativni. To pomeni, da vseh 89 analiziranih vzorcev rastlin, ki so vključevali samosevne in podivjane rastline, nabrane v različnih habitatih v Sloveniji, in 69 vzorcev semena – pridelka oljne ogrščice v Sloveniji v letu 2008 (rastna sezona 2007/2008) ne vsebuje gensko spremenjene oljne ogrščice, ki je v Evropi dovoljena za hrano in krmo, oziroma gensko spremenjene oljne ogrščice, ki vsebuje enega ali več teh elementov. Analizirani vzorci prav tako niso bili okuženi s CaMV-jem, ki bi v nasprotnem primeru lahko dali tudi lažne pozitivne rezultate (angl. false positive results) prisotnosti 35S-promoterja ali Nos-terminatorja.

4.3.1.1 Preverjanje prisotnosti endogenega gena oljne ogrščice (kruciferina)

Prisotnost endogenega gena oljne ogrščice, kruciferina, smo potrdili v vseh vzorcih s terena (89) in pri vseh združenih vzorcih semena oljne ogrščice (17) v obeh ponovitvah. Uspešno namnožitev omenjenega gena v PCR-analizi smo potrdili s prisotnostjo fragmenta na 258 bp (slika 37).



Slika 37: Namnožitev endogenega gena oljne ogrščice (kruciferina) v PCR-analizi

Pri 17 združenih vzorcih (1–17) semena oljne ogrščice v dveh ponovitvah. Neg. kont. = negativna kontrola, poz. kont. = pozitivna kontrola (DNA 0 % RT/GT 73 oljne ogrščice [AOCS-0304A]), NTC = slepi vzorec.

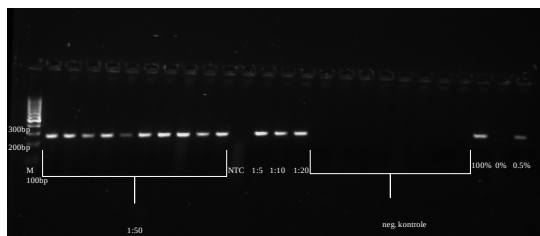
Figure 37: Amplification of endogenous gene cruciferin in PCR analysis.

In 17 comprised seed samples (1-17) in two repetitions. Neg. kont.=negative control; poz. kont.=positive control (DNA 0 % RT/GT 73 oilseed rape [AOCS-0304A]); NTC=non-template control.

4.3.1.2 Preverjanje prisotnosti genskega elementa EPSPS

Prisotnosti EPSPS-transgena nismo potrdili pri nobenem od analiziranih vzorcev, ki vključujejo vzorce s terena (89 samosevnih in podivjanih populacij vrste *B. napus*) in vzorce semena oljne ogrščice (17 združenih vzorcev v dveh ponovitvah). Uspešno

namnožitev omenjenega genskega elementa v PCR-analizi pa smo potrdili s prisotnostjo fragmenta na 274 bp pri RT/GT73-pozitivnem referenčnem materialu. Uspešno smo detektirali tudi prisotnost namnoženih fragmentov v DNA-vzorcih, kjer smo listni material pripravili z razmerjem gensko spremenjene : gensko nespremenjene oljne ogršče RT/GT73 = 1 : 50 pri vseh desetih ponovitvah (slika 38).



Slika 38: Namnožitev EPSPS-transgena (vključenega v transgeno oljno ogrščico RT/GT73) pri kontrolnih vzorcih referenčnega materiala

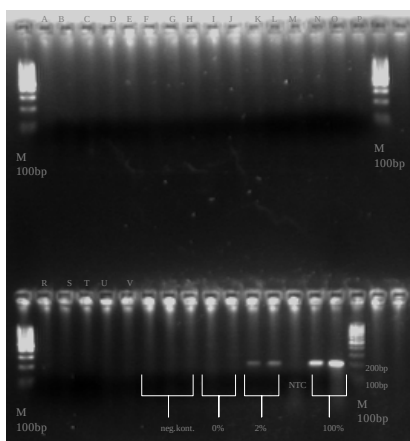
Z 0-, 0,5-, 2- in 100-odstotnim deležem 'RT/GT73' in pri DNA-vzorcih iz listnega materiala, pripravljenega z razmerji gensko spremenjen : gensko nespremenjen = 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20 in 1 : 50 (v desetih ponovitvah) za mejo detekcije. Neg. kontrole = negativne kontrole, NTC = slepi vzorec.

Figure 38: Amplification of EPSPS transgene (included in 'RT/GT73' transgene oilseed rape) reference control material

With 0 %, 0,5 %, 2 % and 100 % portion of 'RT/GT73' and from leaf material prepared from GS/non GS=1:5, 1:10, 1:20 and 1:50 (in 10 repetitions) for limit of detection. Neg. kontrole=negative controls; NTC=non-template control.

4.3.1.3 Preverjanje prisotnosti 35S-promoterja

Prisotnosti 35S-promoterja nismo potrdili pri nobenem od analiziranih vzorcev, ki vključujejo združene vzorce s terena (21 združenih vzorcev samosevnih in podivjanih populacij vrste *B. napus*) (slika 39) in vzorce semena oljne ogršče (17 združenih vzorcev v dveh ponovitvah). Uspešno namnožitev omenjenega genskega elementa v PCR-analizi pa smo potrdili s prisotnostjo fragmenta na 195 bp z 2- in 100-odstotnim deležem transgenih linij 'Oxy235' in 'Falcon GS40/90'.



Slika 39: Namnožitev 35S-promoterja (vključenega v transgeni oljni ogrščici 'Oxy235' in 'Falcon GS40/90') pri združenih vzorcih samosevnih in podivjanih populacij vrste *B. napus*

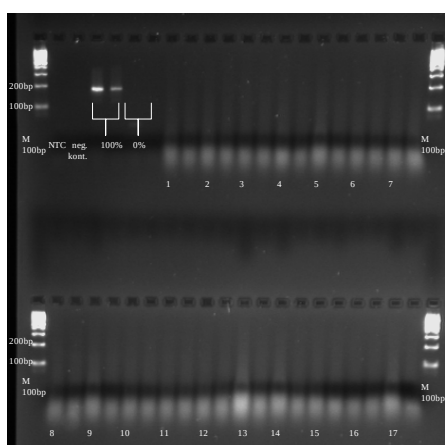
Bulki od A do V in pri kontrolnih vzorcih referenčnega materiala z 0-, 0,5-, 2- in 100-odstotnim deležem 'Oxy235' in 'Falcon GS40/90'. Neg. kont. = negativne kontrole, NTC = slepi vzorec.

Figure 39: Amplification of 35S promoter (included in 'Oxy235' and 'Falcon GS40/90' transgene oilseed rape) in comprised samples of volunteer and feral populations of *B. napus*

Bulks from A to V and with reference control material with 0 %, 0,5 %, 2 % and 100 % portion of 'Oxy235' and 'Falcon GS40/90'. Neg. kont.=negative controls; NTC=non-template control.

4.3.1.4 Preverjanje prisotnosti Nos-terminatorja

Prisotnosti Nos-terminatorja nismo potrdili pri nobenem od analiziranih vzorcev, ki vključujejo združene vzorce s terena (21 združenih vzorcev samosevnih in podivjanih populacij vrste *B. napus*) in vzorce semena oljne ogrščice (17 združenih vzorcev v dveh ponovitvah) (slika 40). Uspešno namnožitev omenjenega genskega elementa v PCR-analizi pa smo potrdili s prisotnostjo fragmenta na 180 bp z 100-odstotnim deležem transgenih linij 'Oxy235' in 'MS8xRF3'.



Slika 40: Namnožitev Nos-terminatorja (vključenega v transgeni oljni ogrščici 'Oxy235' in 'MS8xRF3') pri združenih vzorcih semena oljne ogrščice

Bulki 1–17 v dveh ponovitvah in kontrolnih vzorcih referenčnega materiala z 0- in 100-odstotnim deležem 'Oxy235' in 'MS8xRF3'. Neg. kont. = negativne kontrole, NTC = slepi vzorec.

Figure 40: Amplification of Nos terminator (included in 'Oxy235' and 'MS8xRF3' transgene oilseed rape) in comprised seed samples of oilseed rape

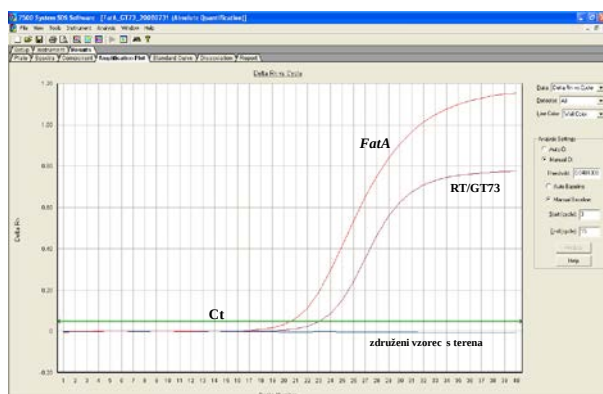
Bulks from 1 -17 and reference control material with 0 % and 100 % portion of 'Oxy235' and 'MS8xRF3'. Neg. kont.=negative controls; NTC=non-template control.

4.3.1.5 Preverjanje prisotnosti bar gena

Prisotnosti bar gena nismo potrdili pri nobenem od analiziranih vzorcev, ki vključujejo združene vzorce s terena (21 združenih vzorcev samosevnih in podivjanih populacij vrste *B. napus*) in vzorce semena oljne ogrščice (17 združenih vzorcev v dveh ponovitvah). Uspešno namnožitev omenjenega genskega elementa v PCR-analizi pa smo potrdili s prisotnostjo fragmenta na 121 bp z 2-, 5- in 100-odstotnim deležem transgenih linij 'MS8xRF3'.

4.3.2 Določitev gensko spremenjenih organizmov vrste *B. napus* z uporabo Q-PCR-analize

Rezultat Q-PCR-analize smo obravnavali kot pozitiven za posamezen genski element, če je bil specifičen PCR-produkt detektiran pod vrednostjo $C_t = 40$. Rezultat Q-PCR-analize je bil obravnavan kot negativen za posamezen genski element, če specifičen PCR-produkt ni bil detektiran (angl. undetermined). Q-PCR-profil endogenega gena, referenčne kontrole (transgena linija 'RT/GT73') in negativnega vzorca s terena so prikazani na sliki 41.



Slika 41: Q-PCR-profil endogenega gena (*FatA*), referenčne kontrole (transgena linija 'RT/GT73') in negativnega vzorca s terena (združeni vzorec B)

Figure 41: Q-PCR profile of endogene gene (*FatA*), reference control (transgene line 'RT/GT73') in negative sample from the field survey (bulk B)

Rezultati analize prisotnosti gensko spremenjenih organizmov vrste *B. napus*, pridobljeni z metodo Q-PCR, na štirih presejalnih genskih elementih (bar, EPSPS, p35S in tNOS) so bili za vse analizirane združene vzorce negativni. To pomeni, da 89 analiziranih vzorcev rastlin, ki so vključevali samosevne in podivjane rastline, nabrane v različnih habitatih v Sloveniji, ne vsebuje gensko spremenjene oljne ogrščice, ki je v Evropi dovoljena za hrano in krmo, oziroma gensko spremenjene oljne ogrščice, ki vsebuje enega ali več teh elementov. Rezultati določitve gensko spremenjenih organizmov vrste *B. napus* so tako z uporabo Q-PCR-analize potrdili rezultate kvalitativne PCR-analize za določitev gensko spremenjenih organizmov vrste *B. napus*. Ker so bili ti rezultati za vse analizirane vzorce (skupno 158 vzorcev) negativni, kvantifikacija gensko spremenjenih organizmov z uporabo Q-PCR-analize ni bila potrebna.

4.4 SKUPNI POVZETEK REZULTATOV

Glede na to, da so rezultati te doktorske disertacije obsežni in porazdeljeni po posameznih točkah, smo zaradi skupnega pregleda rezultatov pripravili povzetek pomembnih postavk, ki jih doktorska disertacija vključuje. Predstavljeni so v tabeli 22, kjer je posamezen parameter opisan z nivoji (od 1 do 5), in sicer glede na izračunane vrednosti, ki jih dosega posamezna skupina genotipov vrste *B. napus* in njenih SKS-jev.

Preglednica 22: Vrednotenje genetske raznolikosti po različnih nivojih glede na posamezno pojavno obliko vrste *B. napus* in njenih SKS-jev

Razvrstitev vsake skupine genotipov glede na izračunano vrednost rezultatov je označena z nivoji, pri čemer je 1 najnižja in 5 najvišja vrednost za posamezen parameter. Oznaka / je uporabljena v primerih, če izračun ne obstaja oziroma izračunana vrednost ni realna.

Table 22: Evaluation of genetic diversity on different levels according to appeared form of *B. napus* and its SKR

Classification of each group of genotypes according to the calculated value of results is labelled with levels, where 1- is the lowest and 5- is the highest value for each parameter. Label / is used in cases where calculated value is not present or relevant.

Parameter/pojavna oblika	Referenčne sorte vrste <i>B. napus</i>	Samosevne populacije vrste <i>B. napus</i>	Podivjane populacije vrste <i>B. napus</i>	Referenčni genotipi SKS-jev	Genotipi SKS-jev s terena (<i>B. rapa</i> in <i>S. arvensis</i>)
Genetska raznolikost (He)	2	3	4	1	5
Prenos genov (frekvenca Na > 5 %)	2	4	3	1	5
Alelna raznolikost (Ne)	2	5	4	1	3
Ocena prenosa ter ustalitve genov (Np)	3	2	5	1	4
Ocena stopnje spontanega oprašitve (F)	2	3	4	1	5
Stopnja tujeprašnosti	/	3	5	/	4
Karakteristike naravnih populacij (HWE)	1	3	4	1	5
Ustreznost obdelave kodominantnih matrik na 2n-nivoju	4	4	4	4	4
Ustreznost obdelave binarnih matrik na 4n-nivoju	3	3	3	3	3
Ustreznost obdelave kodominantnih matrik na 4n-nivoju	5	5	5	5	5
Ustreznost obdelave binarnih matrik na 2n-nivoju	2	2	2	2	2
Prisotnost transgenov	Za vse obravnavane vzorce pridelkov, samosevnih in podivjanih populacij vrste <i>B. napus</i> v letih 2007 in 2008, negativna.				

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

B. napus se v Sloveniji prideluje predvsem kot oljnica, torej kot oljna ogrščica. Obseg pridelave je bil v obdobju 1995–2001 najnižji, zopet pa je začel naraščati leta 2002 (slika 4), ko se je Slovenija pripravljala na vstop v Evropsko unijo. Danes se oljna ogrščica prideluje na približno 1 % vseh pridelovalnih površin v Sloveniji (Rastlinska pridelava, 2011) ter predstavlja pomemben člen v kolobarju konvencionalnega, integriranega in ekološkega kmetovanja. Rastline vrste *B. napus*, ki se ne pojavljajo kot posevki, in njeni SKS-ji, ki se prav tako v naravi pojavljajo kot samosevne, plevelne in podivjane rastline, pa zaradi svoje prisotnosti in možnosti samoohranjanja semena v talni semenski banki predstavljajo vir za spontane oprašitve s posevki vrste *B. napus*, kar vodi do znižanih in manj kakovostnih pridelkov za hrano in krmo, v primeru semenskih posevkov pa do manjše sortne čistosti. V primeru soobstoja pridelave oljne ogrščice in gensko spremenjene oljne ogrščice bi prav tako lahko prišlo do spontanih oprašitev v naravi, ki bi bile nepredvidljive ter bi vplivale na razvoj vrst in agrobiodiverziteto znotraj družine Brassicaceae.

V razpravi smo kot vire največkrat navajali študije Ellinga in sod. (2009), Hasana in sod. (2006, 2008), Pascherja in sod. (2006) ter Pascherja in sod. (2010), saj te metodološko in po namenu raziskav najbolj ustrezajo temi doktorske disertacije. Njihovi rezultati so zato tudi najlažje primerljivi z našimi.

5.1.1 Zbiranje in pojavnost genskih virov vrste *B. napus* ter njenih spolno kompatibilnih sorodnikov

Analiza genetske raznolikosti in prenosa genov vrste *B. napus* ter njenih SKS-jev je bila v doktorski disertaciji izvedena na nacionalnem nivoju, torej je zajemala vzorce iz območja celotne Slovenije, ki so bili zbrani v zaporednem štiriletnem časovnem obdobju. Primerljive študije, ki so bile v Evropi in v svetu objavljene na to temo, so zajemale le določeno pridelovalno območje (regijo) (Pascher in sod., 2006 in 2010). Poleg tega so omenjeni avtorji prostorsko in genetsko povezanost med zbranimi genotipi vrednotili le z uporabo manjšega števila mikrosatelitnih markerjev (pet in devet), ki so izvirali samo iz vrste *B. napus*, saj SKS-jev v analizo niso vključili. Rezultate so podali le na podlagi enoletne genetske identifikacije, v katero so tako kot mi vključili referenčne genotipe sort vrste *B. napus*, ki so se v preteklih štirih letih pridelovali v obravnavani regiji. Njihov namen je bil identificirati predvsem izvor podivjanih populacij vrste *B. napus* brez povezave s prenosom genov z njenimi SKS-ji, zato so tudi vsako referenčno sorto v analizo vključili v obliki osmih genotipov iste sorte, medtem ko smo mi vključili tri genotipe iste sorte. Naša doktorska disertacija vključuje referenčne sorte vrste *B. napus*, ki so se v zadnjih 36 letih pridelovale na območju Slovenije (preglednica 2), razen sort 'Petrol', 'Danica' in 'Zora', katerih semena nismo uspeli pridobiti, ter referenčne sorte SKS-jev, ki so se prav tako pridelovali v tem obdobju (preglednica 3) oziroma se pojavljajo kot plevelne ali podivjane vrste na območju Slovenije. Nobena izmed omenjenih študij pa ne zajema zelenjadnih oblik vrste *B. napus*, ki jih zajema naša doktorska disertacija, razen študij genetske raznolikosti genskega sklada vrste *B. napus*, ki so jih objavili Hasan in sod.

(2006) ter Elling in sod. (2009). Rezultati obeh študij, ki so jih objavili Pascher in sod. (2006 in 2010), so prikazani na podlagi kodominantnih vhodnih matrik na 2n-nivoju. Študija, ki so jo objavili Elling in sod. (2009), je bila prav tako izvedena v štiriletnem časovnem obdobju (2004–2007), in sicer na podlagi uporabe štirih mikrosatelitnih markerjev (trije izmed teh so vključeni tudi v našo doktorsko disertacijo), izoliranih le iz vrste *B. napus* za GA ponavljajočim se motivom. Rezultati so bili prikazani na podlagi binarne vhodne matrike prisotnosti namnoženih lokusov v vzorcih. Ta analiza je poleg referenčnih sort vrste *B. napus* zajemala tudi nekatere referenčne predstavnike SKS-jev, tako kot v naši doktorski disertaciji, le da smo mi za genetsko identifikacijo uporabili mikrosatelitne markerje, ki so izvirali tudi iz vrst SKS-jev (ne samo iz vrste *B. napus*). Poleg tega doktorska disertacija zajema tudi SKS-je, ki se pojavljajo v naravi kot plevelne ali podivjane rastline, kar pa do sedaj še ni bilo objavljeno. Da pa sta si morfološko vrsti *B. napus* in *B. rapa* res zelo podobni, priča študija Ellinga in sod. (2009), v kateri so za identifikacijo podivjanih populacij, za katere na podlagi morfoloških znakov niso bili prepričani, ali gre za vrsto *B. napus* ali za vrsto *B. rapa*, morali uporabiti tudi metodo pretočne citometrije, s katero so določili število kromosomov v genomu in tako identificirali vrsto.

Izmed vseh SKS-jev vrste *B. napus*, ki se pojavljajo v Sloveniji, smo v času cvetenja vrste *B. napus* (ko so rastline najbolj opazne) po pričakovanjih kot plevelne ali podivjane našli le vrsti *B. rapa* in *S. arvensis*. Splošno znano je, da ti dve vrsti predstavljata plevela znotraj pridelovalnih območij, da se obe ohranjata v talni semenski banki in da cvetita istočasno kot vrsta *B. napus*. Ker doktorska disertacija zajema tako referenčne kot tudi v naravi najdene pojavnne oblike vrste *B. napus* in njene SKS-je v štiriletnem časovnem obdobju, rezultati disertacije odražajo dejansko stanje pojavnosti teh rastlin v slovenskem pridelovalnem prostoru.

Pojavnost samosevni in predvsem podivjanih populacij v Sloveniji je odvisna od obsega pridelave oljne ogrščice po posameznih statističnih regijah, saj je v tistih regijah, kjer je obseg pridelave največji (Pipan in sod., 2011), tudi dejanska možnost pojavljanja nekultiviranih oblik vrste *B. napus* najvišja.

5.1.2 Ustreznost načina obdelave rezultatov

Kot je bilo opisano v točki 2.4.2, se v analizah genetske raznolikosti uporabljajo različne metode določitve namnoženih alelov znotraj istega lokusa. Pascher in sod. (2006, 2010) so uporabljali metodo natančne določitve dolžin alelov v fragmentni analizi, izvedeni po principu kapilarne elektroforeze na 2n-nivoju, pri čemer so kot vhodni podatek v statističnih obdelavah uporabili kodominantno matriko. Tak način je uporabljen tudi v tej doktorski disertaciji, pri čemer smo del rezultatov prikazali tudi na podlagi kodominantne vhodne matrike na 4n-nivoju v programu Structure 2.3.3 (Pitchard in sod., 2009). Rezultati obeh obdelav so bili primerljivi, saj smo povsod izračunali enako število genetskih skupin (angl. real $K = 7$), vendar pa je prišlo do odstopanj v povprečnih vrednostih H_e in F_{st} . Povprečna vrednost H_e , ki predstavlja genetsko raznolikost, je bila znotraj vseh sedmih genetskih skupin pri 2n-kodominantni matriki nižja ($H_e = 0,61$) kot pri 4n-kodominantni matriki ($H_e = 0,645$), kar pomeni, da 4n-kodominantna matrika zajame več genetske raznolikosti in s tem poda natančnejšo genetsko informacijo. Poleg tega pa nižja povprečna

vrednost F_{st} znotraj sedmih genetskih skupin na 4n-nivoju predstavlja realnejšo oceno izenačenosti genotipov med genetskimi skupinami in je nižja zato, ker se obravnavane populacije (tako naravne kot referenčne) razvijajo v smeri čim večje genetske izenačenosti. Poleg tega vrednost F_{st} na 4n-nivoju predstavlja tudi realnejšo oceno ohranitve in ustalitve genov, saj zajame natančnejšo genetsko identifikacijo posameznega genotipa znotraj genetske skupine. Molla in sod. (2010) so v svoji objavi, ki je bila prav tako narejena na podlagi 4n-genotipizacije dolžin alelov (določitev ni bila izvedena na podlagi fragmentne analize na genetskem analizatorju, temveč na podlagi SDS-PAGE-metode), izpostavili pomembnost stopnje ploidnosti za identifikacijo rastlin vrste *B. napus* z uporabo mikrosatelitnih markerjev. Ugotavljajo namreč, da so, glede na to, da so mikrosateliti optimalno uporabni za genetsko identifikacijo 2n-organizmov, ustrezni tudi za amfidiploide, predvsem ko gre za uporabo kodominantnih vhodnih matrik, saj te vključujejo tudi možnost detekcije prisotnih mikromutacij v genomu, kar je še posebej uporabno za populacije, ki so prisotne v naravi. Elling in sod. (2009) so svoje rezultate objavili na podlagi uporabe le štirih mikrosatelitnih markerjev, prisotnost/odsotnost namnoženih fragmentov na vsakem lokusu pa so določili prav tako z uporabo DNA-sekvenatorja, torej kapilarne elektroforeze. Identično smo analizo izvedli tudi v doktorski disertaciji, ko smo kot vhodni podatek za statistične analize uporabili binarno vhodno matriko na 4n-nivoju (točka 4.2.2), kjer je obdelava zelo podobna obdelavi rezultatov AFLP-analize, kot so v svoji objavi opisali tudi Nemri in sod. (2012). Hasan in sod. (2006 in 2008) so v svojih analizah obdelovali rezultate na podlagi binarnih vhodnih matrik, izdelanih po metodi, ki so jo opisali Alamerew in sod. (2004) za analizo poliploidne pšenice. Tudi Bond in sod. (2004) so izvedli identifikacijo podivjanih populacij vrste *B. napus* na podlagi binarnih vhodnih matrik, prisotnost namnoženih fragmentov na posameznem lokusu pa so določevali na akrilamidnem gelu.

V nobeni izmed objav pa do sedaj še nismo zasledili, da bi rezultate o genotipizaciji znotraj družine Brassicaceae primerjali na podlagi različnih obdelav, saj so pri vseh ubrali eno ali drugo pot. V doktorski disertaciji smo poudarek usmerili na izdelavo kodominantnih matrik alelnih dolžin na 2n-nivoju, saj se nam je ta pot glede na predhodne objave in naša predvidevanja zdela najbolj optimalen kompromis glede na genetski izvor obravnavanih genotipov ter razpoložljivost računalniških programov za statistično obdelavo rezultatov in parametrov populacijske genetike, ki omogočajo tudi ocene stopenj prenosa in ustalitve genov v naravi prek spontanega križanja. Poleg tega smo za primerjavo izvedli tudi Bayesovo klastersko analizo za iste genotipe, in sicer z uporabo kodominantne vhodne matrike na 4n-nivoju, ter z Mantelovim testom primerjali binarno vhodno matriko na 4n-nivoju in kodominantno vhodno matriko na 2n-nivoju. Take primerjave skladnosti obeh matrik nismo zasledili v nobeni objavi, zato smo želeli podati neko objektivno oceno primerjave obeh pristopov, ki se najpogosteje uporabljata v analizah genetske raznolikosti vrste *B. napus* ter identifikacije podivjanih populacij in prenosa genov s SKS-ji znotraj družine Brassicaceae. Ugotovili smo, da je skladnost obeh matrik, v kateri smo vključili tako referenčne genotipe kot tudi v naravi pojavljajoče se populacije vrste *B. napus* in njene SKS-je, dobra ($r_{xy} = 0,851$). Kljub temu pa se pri pretvorbi iz 2n-kodominantne matrike v 4n-binarno matriko izgubi kar 14,9 % genetske informacije, kar pomeni, da je v tem primeru bolje izbrati obdelavo rezultatov v obliki natančno določenih alelnih dolžin na 2n-nivoju. Zelo dobro povezanost med matrikama ($r_{xy} = 0,914$) pa smo izračunali, ko smo v analizo skladnosti vključili le referenčne genotipe sort vrste *B. napus*, kar je verjetno

posledica genetskega izvora referenčnih sort, ki izhajajo iz žlahtniteljskih postopkov. V primeru genotipizacije referenčnih sort vrste *B. napus* dejansko ni pomemben pristop obdelave rezultatov in so uporabni ne glede na to, ali so obdelani na podlagi 4n-binarnih matrik ali 2n-kodominantnih matrik.

5.1.3 Vrednotenje mikrosatelitnih markerjev

Na začetku smo analizo genetske raznolikosti želeli izvesti na podlagi seta 49 mikrosatelitnih markerjev, vendar pa smo zaradi neprimernosti štirih parov začetnih oligonukleotidov v PCR-analizi in težav z optimizacijami le-te izključili.

Doktorska disertacija v primeru genetske analize genskega sklada vrste *B. napus* predstavlja rezultate na podlagi uporabe 45 mikrosatelitnih markerjev, ki izhajajo ne samo iz vrste *B. napus*, temveč tudi iz vrst njenih SKS-jev (*B. rapa*, *B. oleracea* in *B. nigra*) ter na splošno iz rodu *Brassica*. Izbrani mikrosatelitni markerji se nahajajo na različnih lokusih in kromosomih znotraj genoma vrste *B. napus* (Lowe in sod., 2004). Pascher in sod. (2006 in 2010) so v obeh študijah uporabili le mikrosatelitne markerje, ki izvirajo izključno iz vrste *B. napus* in vključujejo dinukleotidni ponavljajoči se motiv v genomu (enostavni mikrosatelit). V doktorsko disertacijo smo vključili tako enostavne kot tudi sestavljene mikrosatelite z di-, tri-, tetra- in pentanukleotidnim motivom, tako da smo zagotovili še večjo specifičnost namnožitve znotraj istega genoma različnih populacij vrste *B. napus*. Suwabe in sod. (2004) so ocenjevali naravo mikrosatelitov v genomu *B. rapa* z namenom, da bi pridobili informativne in zanesljive markerje za analizo genskega sklada znotraj družine Brassicaceae. Ugotovili so, da se je v genomu vrste *B. rapa* najpogosteje pojavljal mikrosatelitni motiv (GA)_n, in sicer s frekvenco na vsakih $4,8 \times 10^5$ bp, ki mu sledi (CAA)_n na vsakih $5,0 \times 10^5$ bp. Poleg tega so izračunali tudi, da je bila PIC-vrednost pri dinukleotidnih mikrosatelitnih motivih največja. Več kot 90 % vključenih mikrosatelitnih markerjev se je uspešno namnožilo znotraj odgovarjajočih genomskega regij tudi pri ostalih vrstah iz rodu *Brassica*. Še več, ti so se uspešno namnožili tudi v sorodnih vrstah znotraj družine Brassicaceae, in sicer 78,5 % znotraj vrste *R. sativus*, 68,6 % znotraj vrste *S. alba* in 39,8 % znotraj vrste *A. thaliana*. V svoji študiji so Hasan in sod. (2006) uporabili 30 mikrosatelitnih markerjev, ki so prav tako izvirali iz vrste *B. napus* in iz obeh njenih starševskih vrst, torej iz *B. rapa* in *B. oleracea*, s prav tako različnimi ponavljajočimi se motivi. Podobno kot v naši doktorski disertaciji so tudi v tej študiji za genetsko analizo zaradi vključenosti velikega števila mikrosatelitnih markerjev uporabili ekonomično metodo fluorescentnega označevanja z univerzalnim zaporedjem. Njihova metoda je vključevala M13-univerzalno zaporedje, ki ga sta objavila Berg in Olaisen (1994), v naši doktorski disertaciji pa smo uporabili M13(-21)-univerzalno zaporedje po metodi, ki jo je opisal Schuelke (2000). M13-metodo označevanja z univerzalnim zaporedjem so Hasan in sod. (2008) uporabili tudi pri identifikaciji mikrosatelitnih lokusov, ki so povezani z vsebnostjo glukozinolatov v semenu oljne ogršče.

Če primerjamo specifičnost mikrosatelitnih markerjev, ki smo jih uporabili v doktorski disertaciji, in specifičnost mikrosatelitnih markerjev, ki se uporabljajo za genotipizacijo sort vinske trte (*Vitis vinifera* L.), ki se razmnožuje vegetativno, lahko ugotovimo, da so mikrosatelitni markerji zelo uporabni in informativni tudi pri odkrivanju zelo majhnih genetskih razlik v genomu iste sorte, ki se je zaradi različnih poimenovanj v preteklosti

različno obravnavala (Rusjan in sod., 2012). Parametri vrednotenja mikrosatelitnih markerjev (Ho, He, PIC, PI; No) so pri vinski trti zelo uporabni, saj na njihovi podlagi raziskovalci med sabo primerjajo genotipe iz različnih pridelovalnih območij. Teh parametrov v objavah, ki so povezani z vrsto *B. napus* in njenimi SKS-ji, nismo zasledili veliko, mogoče tudi zato, ker na podlagi obdelav binarnih vhodnih matrik vseh teh parametrov ni mogoče izračunati. Polege tega pa objave, ki svoje rezultate podajajo v obliki kodominantnih matrik, teh parametrov ne zajemajo, zato tudi primerjave z našimi rezultati niso mogoče. Sicer pa se nam ti parametri zdijo zelo pomembni, saj predstavljajo neko celostno oceno ustreznosti izbire mikrosatelitnih markerjev v analizi, saj nas nadvse zanima, na katerem lokusu so med različnimi genomi največje razlike in kateri se za določeno skupino genotipov izkažejo za najbolj informativne.

Genetsko raznolikost genskega sklada referenčnih sort vrste *B. napus*, ki so se v Sloveniji pridelovale od leta 1984 dalje, smo opisali na podlagi 45 mikrosatelitnih markerjev. Na vseh lokusih smo skupno določili 572 alelov v razponu od 4 na lokusu Ni4-G04 do 26 na lokusu Na12-C06. Povprečna PIC-vrednost je na vseh lokusih znašala 0,618, kar predstavlja zelo visoko vrednost, glede na to, da smo genetsko raznolikost spremljali znotraj iste vrste (*B. napus* subsp. *napus*) z mikrosatelitnimi markerji, ki prav tako izvirajo iz njenih SKS-jev in so različnih struktur ter ponavljajočih se motivov. Za primerjavo so Wang in sod. (2012) v svoji študiji na podlagi 40 mikrosatelitnih markerjev in 192 genotipov oljne ogrščice (mi smo jih v analizo vključili 168) izračunali povprečno PIC-vrednost, ki je znašala 0,337. Kot najbolj informativen se je v naši analizi izkazal lokus Ol11-D12 (PIC = 0,881), ki izvira iz ene izmed starševskih vrst vrste *B. napus*. Glede na to, da so bile v analizo vključene samo referenčne sorte, smo pričakovali, da je zaradi usmerjene selekcije in žlahtnjenja razporejenost alelov med obravnavanimi genotipi enakomerna in da na obrobni regijah mikrosatelitnega lokusa ni prisotnih ničtih alelov. Ti dve domnevi smo potrdili z zelo nizkim zmnožkom PI-vrednosti na vseh lokusih ($1,54 \times 10^{-40}$) in s skupno negativno povprečno vrednostjo ničtih alelov (No = -0,230). Zaradi selekcije je prav tako povprečna dejanska heterozigotnost višja od pričakovane, to odstopanje pa predstavlja presežek heterozigotov. To razlaga dejstvo, da smo v analizi zajeli obsežen genski sklad, ki obstaja v Sloveniji s sortami, ki predstavljajo vir genetske variabilnosti in ki se lahko vnesejo v pridelovalni prostor. Če vse te rezultate primerjamo z rezultati parametrov variabilnosti na podlagi celotne analize genetske raznolikosti, v katero so vključene referenčne sorte vrste *B. napus*, referenčne sorte SKS-jev, vse pojavne oblike vrste *B. napus* in SKS-ji v naravi, lahko vidimo, da je stopnja uspešnosti razločevanja v obsežnejši analizi pričakovano višja (PIC = 0,690), saj je šlo za analizo genetske raznolikosti spolno kompatibilnih vrst znotraj družine Brassicaceae. Neprimerno višja je tudi vrednost števila alelov, ki smo jih določili na vseh lokusih (N = 917), in v povprečju smo na posameznem lokusu določili tudi višje število alelov (20,4), medtem ko je bila pri analizi znotraj referenčnih sort vrste *B. napus* ta vrednost le 12,7. Vse te višje vrednosti so odraz dejanskega potenciala za genetsko raznolikost, ki je na voljo vrsti *B. napus* in njenim SKS-jem za ohranjanje agrobiodiverzitete v slovenskem pridelovalnem prostoru. Da pa je ta na zelo visoki stopnji, priča tudi visoka stopnja pričakovane heterozigotnosti (He = 0,715 in je v tem primeru višja od Ho, kar predstavlja visoko stopnjo sorodnosti vključenih vrst), ki obenem odraža genetsko raznolikost spolno kompatibilnih vrst z vrsto *B. napus* v Sloveniji. Odstopanje He od Ho pa odraža tudi populacijsko dinamiko obravnavanih genotipov. Na podlagi izračunanih parametrov variabilnosti lahko zaključimo, da je bila

izbira seta 45 mikrosatelitnih markerjev za namene doktorske disertacije ustrezna, kar je osnova za učinkovito opravljeno genetsko analizo.

Gledano z uporabniškega stališča, kjer je treba analizo izvesti na ožjem izboru genotipov izmed vseh genotipov, vključenih v doktorsko disertacijo, in zaradi znižanja stroškov analiz izvesti tudi hkratno uporabo manjšega, vendar še vedno zadosti informativnega seta mikrosatelitnih markerjev, smo genetsko analizo izvedli na podlagi uporabe 15 mikrosatelitnih markerjev. Izkazalo se je, da je kljub močnemu zmanjšanju števila mikrosatelitnih markerjev analiza še vedno zelo učinkovita, saj je povprečna PIC-vrednost znašala 0,664, kar je le za 0,026 manj kot pri analizi s setom 45 mikrosatelitov. Tudi povprečna vrednost določenih alelov na lokus odstopa le za 1,8. Omenjena odstopanja velja pripisati predvsem genetski raznolikosti, za katero imajo potencial v naravi najdene populacije vrste *B. napus* in SKS-ji, ki v to analizo niso bili vključeni, nekoliko manj pa zmanjšanju obsega mikrosatelitnih markerjev v analizi, saj so se vsi izkazali kot zelo specifični in visoko informativni. Kot najbolj uporabni so se za razločevanje referenčnih genotipov vrste *B. napus* in referenčnih genotipov SKS-jev izkazali mikrosateliti, izolirani iz vrst *B. napus* in *B. nigra*, pri katerih je bila PIC-vrednost manjša od 0,8 (Ni4-H04, Na12-C08, Ni4-D09 in Na10-A08).

5.1.4 Genetska raznolikost znotraj vrste *B. napus* in vrednotenje intraspecijskih križanj

V Sloveniji je genetska raznolikost sort, ki jih imajo pridelovalci na izbiro, visoka, kar smo potrdili tudi z rezultati naših analiz ($H_e = 0,654$). Tako stanje je posledica vsestranske uporabnosti in usmerjene selekcije v preteklosti, saj je žlahtnjenje potekalo tako v smeri pridobivanja krmnih in oljnih sort kot tudi zelenjadnih oblik vrste *B. napus*. Ko smo v analizo vključili tudi obe sorti podzemne kolerabe, se je stopnja genetske raznolikosti še povečala ($H_e = 0,657$), ob tem pa se je povečala tudi stopnja sposobnosti uporabljenih mikrosatelitov za razločevanje obeh podvrst ($PIC = 0,623$). V tem primeru se je kot najbolj informativen marker izkazal Na12-C06 ($PIC = 0,891$). Ta lokus, ki izvira iz vrste *B. napus* in ima dinukleotidni ponavljajoči se motiv GA, so v svojih študijah genetske identifikacije uporabili Pascher in sod. (2006 in 2010) ter Elling in sod. (2009).

Genetska izenačenost znotraj referenčnih sort je bila praktično 100-odstotna, saj na podlagi nedoločenega alelnega modela (analiza AMOVA na podlagi F-statistike) molekulske variance med genotipi znotraj referenčnih sort ni bilo. Če pa smo v analizi upoštevali variabilnost med alelnimi dolžinami, ki vključuje tudi prisotnost mutacij v genomih (Pascher in sod., 2006) referenčnih sort zaradi evolucije (analiza AMOVA na podlagi R-statistike), pa je bila izračunana molekulska varianca med genotipi znotraj sort 7-odstotna. Glede na to, da so Pascher in sod. (2010) v svoji študiji v analizo vključili 20 referenčnih (komercialnih) sort in da je bila na podlagi normiranega Shannonovega indeksa le sorta 'Idol' 100-odstotno izenačena (vseh osem genotipov je imelo enak alelni profil), lahko sklepamo, da je za naše rezultate veliko realnejša ocena na podlagi R-statistike. Poleg tega je ta vrednost ustreznejša tudi zato, ker smo pri pripravi vzorcev iz rastlinskega materiala posamezne rastlinice med sabo združevali, tako da je vsak izmed treh genotipov iste sorte vključeval rastlinski material iz več rastlin in je bila genetska raznolikost tako nekoliko večja. V repertoar referenčnih sort smo izmed skupno 56 vključili 16 hibridov, kar

predstavlja 29-odstotni delež, ostalo pa so linije, znotraj katerih je že v osnovi genetska izenačenost nižja kot znotraj hibridov. Vsi genotipi znotraj vseh referenčnih sort ustrezajo tudi zahtevam vrednosti HWE, kar pomeni, da se frekvence alelov med genotipi teh sort v naslednjih generacijah ne bodo spreminjale, če ti ne bodo izpostavljeni prenosu genov, selekciji in genetskemu zdrsu.

Genetska raznolikost med referenčnimi sortami vrste *B. napus* je na podlagi naših rezultatov tolikšna, da obravnavne sorte razvršča v štiri genetske skupine, ki v grobem ločujejo sorte glede na uporabnost in formo, ne pa v celoti, kar je podobno, kot so jih razvrstili tudi Hasan in sod. (2006). Tako pri naših kot tudi pri njihovih rezultatih ni ravno jasne meje med oljnimi in krmnimi ter ozimnimi in jarimi oblikami, vseeno pa osnovna razdelitev obstaja. Med drugim smo ugotovili, da sta si obe sorti kolerabe tudi genetsko zelo blizu in hkrati precej oddaljeni od predstavnikov druge podvrste, razen sort 'Bienvenue' in 'Viva', ki sta obe stari sorti, ki sta se v Sloveniji pridelovali med prvimi (Pipan in sod., 2011). Poleg tega je analiza na podlagi Neijeve standardne genetske razdalje in UPGMA-metode združevanja od izmed skupno 16 kar 10 hibridov razporedila v isto skupino. Od tega so trije hibridi in ena linija ('PR46W24', 'PR46W14', 'PR46W15' in 'PR45D03') na skupni filogenetski veji, saj vsi izhajajo iz iste žlahtniteljske hiše, iz česar sklepamo, da imajo skupen izvorni material.

Na podlagi primerjave parametrov variabilnosti med referenčnimi genotipi sort vrste *B. napus* in samosevnimi populacijami smo izračunali razliko med stopnjama genetske raznolikosti (H_e), ki je znotraj referenčnih sort znašala 0,66, znotraj samosevnih populacij pa 0,72. To odstopanje pomeni, da so samosevne populacije, ki izhajajo iz referenčnih sort in so spontanim križanjem izpostavljene le eno leto, veliko bolj raznolike kot njihov genetski izvor, kar je posledica vključevanja novih alelov v samosevne populacije prek spontanih križanj z ostalimi spolno kompatibilnimi genskimi viri, ki so prisotni v slovenskem pridelovalnem prostoru. To potrjujejo tudi višje vrednosti Shannonovega informacijskega indeksa znotraj samosevnih populacij ($I = 1,73$), ki prav tako odraža genetsko raznolikost. Če pa vrednosti parametrov genetske raznolikosti primerjamo med vsemi pojavnimi oblikami (referenčne v obdobju 1984–2010, samosevne in podivjane v obdobju 2007–2010) vrste *B. napus* v naravi na območju Slovenije, pa ugotovimo, da je vrednost H_e znotraj podivjanih populacij (0,69) višja od vrednosti pri referenčnih sortah in nižja od vrednosti samosevnih populacij. Enako velja za vrednost Shannonovega informacijskega indeksa ($I = 1,71$). Na podlagi teh izračunov lahko sklepamo, da je prišlo do spontanih oprašitev posevkov v naravi, ki so se v naslednjem letu pojavljali kot samosevne rastline (zato sta vrednosti H_e in I znotraj samosevnih populacij najvišji), ni pa še prišlo do ustalitve prenesenih genov v genome takratnih samosevnih rastlin. Z večletnim samoohranjanjem semena teh rastlin zunaj pridelovalnih površin in s pojavom teh rastlin v naravi pa so se nekateri preneseni geni le ustalili v genomih sedaj že podivjanih populacij, kar smo potrdili tudi z izračunom hkratnih najvišjih vrednosti števila privatnih (4,60) in različnih alelov (15,67) v štiriletnem časovnem obdobju. Tudi Pascher in sod. (2010) so v svoji študiji na podlagi enoletnega pojavljanja v naravi izračunali višjo genetsko raznolikost znotraj podivjanih populacij neznanega genetskega izvora ($H_e = 0,58$) kot znotraj 19 referenčnih sort (0,23). Delež polimorfnih lokusov za razločevanje med genotipi podivjanih populacij je v njihovi analizi znašal 71,01 %, v naši analizi, ki vključuje tudi samosevne populacije, pa 99,30 %. Prenos genov med referenčnimi sortami in

samosevnimi populacijami na podlagi Barton-Slatkinove ocene je bil po pričakovanjih višji ($m = 2,209$) kot med referenčnimi sortami in podivjanimi populacijami ($m = 2,003$), kar pomeni, da so glede na genetski izvor samosevne populacije bližje referenčnim sortam, iz katerih izvirajo, ker so manj časa izpostavljene tujim oprašitvam v naravi kot podivjane populacije, v katerih se preneseni geni že lahko ustalijo. Povprečna stopnja tujeprašnosti znotraj samosevnih populacij v štiriletnem časovnem obdobju v Sloveniji je znašala 0,865, kar pomeni, da je bila 13,5-odstotna, znotraj podivjanih populacij pa je bila za isto obdobje 13,8-odstotna ($t = 0,862$). Glede na to, da je vrsta *B. napus* v osnovi obravnavana kot samoprašna rastlinska vrsta z variabilno stopnjo tujeprašnosti, in sicer od 5 do 30 % (Treu in Emberlin, 2000), smo na podlagi naših rezultatov ugotovili, da povprečna stopnja tujeprašnosti vrste *B. napus* v slovenskem pridelovalnem prostoru znotraj tega intervala znaša 13,7 %. Ta vrednost je pridobljena na podlagi štiriletnega spremljanja dejanskih spontanov oprašitev, ki se dogajajo v naravi med samosevnimi in podivjanimi oblikami vrste *B. napus* in so značilne za slovenske pridelovalne razmere. Stopnja tujeprašnosti med posevki pa je dosegla vrednost 1,055, kar presega vrednost 1 in zaradi izračunane negativne vrednosti fiksacijskega indeksa ni realna (He in sod., 2012). Zaradi heterotične in usmerjene selekcije v žlahtnjenju vrste *B. napus*, kjer prav tako ni doprinosov prek vplivov okolja in s tem povezanih spontanov križanj, v katera posevki niso bili vključeni – glede na to, da so v naravi dejansko cveteli prvič. Če pa v izračun povprečne stopnje tujeprašnosti vrste *B. napus* vključimo tudi posevke, bi povprečna stopnja tujeprašnosti vrste *B. napus* v slovenskem pridelovalnem prostoru znašala 7,3 %. Da pa je stopnja intraspecijske izmenjave genov najvišja med samosevnimi in podivjanimi populacijami, smo dokazali z najvišjo izračunano vrednostjo števila migrantov med tema dvema pojavnima oblikama vrste *B. napus* ($N_m = 58,02$), iz česar lahko sklepamo, da je 13,7-odstotna stopnja prenosa genov realnejša ocena za slovenski pridelovalni prostor. Samosevne in podivjane populacije, ki smo jih na območju Slovenije zbrali v štirih letih, ne odražajo vrednosti HWE, kar uvršča ti dve pojavnosti obliki med naravne populacije oziroma populacije, ki se lahko samoohranjajo v naravi.

Nepredvidljiva pojavnost rastlin, ki vzkljujejo iz semena iz talne semenske banke (Debeljak in sod., 2008), je vzbudila pozornost, saj smo med 260 lokacijami našli le devet lokacij, kjer so se rastline vrste *B. napus* v vseh štirih letih terenskega vzorčenja vsaj dvakrat ponovno pojavile. Iz tega bi lahko sklepali, da je tudi v Sloveniji veliko dejavnikov, ki vplivajo na pojavnost rastlin vrste *B. napus* iz talne semenske banke, in da je težko napovedati pod kakšnimi pogoji bo to seme vzklilo ter se v naravi pojavilo kot neopredeljen opraševalni vir, ki se lahko samoohranja iz generacije v generacijo. Zanimale pa so nas tudi spremembe v alelni strukturi rastlin, ki se lahko na isti lokaciji samoohranjajo. Ugotovili smo, da je znotraj vseh lokacij fiksacijski indeks negativen, kar pomeni tudi nerealen izračun stopenj tujeprašnosti, saj je $t > 1$; kljub temu pa te vrednosti pomenijo, da so se v štirih letih prisotnosti v naravi v času cvetenja rastline znotraj iste lokacije samoopraševale. Najvišja stopnja samooprašitve je bila izračunana znotraj lokacije Logatec ($t = 2,860$) v dveh zaporednih letih, najnižjo stopnjo samoprašnosti pa smo določili znotraj lokacije Kapla v treh zaporednih letih ($t = 1,099$). Privard in sod. (2008) so na podlagi štiriletnega spremljanja pojavnosti rastlin vrste *B. napus* v naravi (na območju Francije) ugotovili, da med 35–40 % obravnavanih populacij zaradi premeščanja semena izvira iz sosednjih pridelovalnih površin, približno enak odstotek podivjanih populacij pa izvira iz ohranjenega semena v talni semenski banki. Premeščanje semena se na podlagi

njihovih ugotovitev najbolj pogosto dogaja v času žetve, manj pogosto pa v času setve oljne ogrščice. Ugotovili so tudi, da je lokalno (točkovno) samoohranjanje redko in ne presega več kot 10 % podivjanih populacij. Na podlagi rezultatov naše analize, ki je bila izvedena za slovenski pridelovalni prostor, je ta delež še nekoliko nižji in znaša 3,5 % v prav tako štiriletnem časovnem obdobju (od 260 lokacij so se v štirih letih le na devetih lokacijah več kot enkrat pojavile rastline vrste *B. napus*).

Genetska struktura samosevnih populacij v primerjavi z referenčnimi genotipi sort vrste *B. napus* je bolj raznolika kot pri referenčnih sortah. To potrjujejo tudi rezultati analize AMOVA, kjer smo izračunali negativni delež (–7,7 %) molekulske variabilnosti med genotipi znotraj populacij, ki so v tem primeru predstavljale referenčne sorte in samosevne rastline. Negativna vrednost molekulske variabilnosti pomeni obstoj panmiksije (naključne oprašitve) (Weber in sod., 1998), ki obstaja med genotipi znotraj sort in med samosevnimi rastlinami, saj te izvirajo iz istega genskega sklada in si zato del genetske variabilnosti delijo. Negativno vrednost znotraj analize AMOVA so med genotipi znotraj referenčnih sort izračunali tudi Pascher in sod. (2010). V primeru podivjanih populacij pa je genetska raznolikost znotraj njih zaradi vnosa tujih alelov prek spontanega križanja v naravi že tolikšna, da je molekulska variabilnost med genotipi znotraj populacij (v tem primeru referenčnih sort in podivjanih populacij) pozitivna in znaša 7 %. Ugotovili smo tudi, da ne obstaja vzorec, na podlagi katerega bi trdili, da se določeni genotipi oziroma najbolj sorodni genotipi pojavljajo tudi znotraj iste statistične regije. Rezultati analize AMOVA so pokazali, da je 97-odstotna molekulska variabilnost izračunana med genotipi znotraj iste statistične regije in le 3-odstotna med posameznimi regijami v Sloveniji. Te rezultate smo potrdili tudi z Mantelovim testom, s pomočjo katerega smo primerjali geografsko in genetsko skladnost vzorčenih podivjanih populacij, saj je r_{xy} znašal 0,044. Podobne rezultate smo dobili tudi, ko smo v analizo poleg podivjanih populacij vključili še samosevne populacije in posevke, ki smo jih zbrali na terenu. Izračunali smo še nižjo vrednost, ki odraža skladnost genetske in geografske matrike ($r_{xy} = -0,027$), in nizko vrednost lokalnega indikatorja prostorske avtokorelacije ($r = 0,048$). Slednji odraža nizko stopnjo geografske povezanosti lokacij, na katerih smo vzorčili vse tri pojavne oblike. Glede na to, da je vrednost r pozitivna, pa vseeno predstavlja neko geografsko povezanost, predvsem na račun majhnih razdalj znotraj Slovenije.

5.1.5 Genetska raznolikost spolno kompatibilnih sorodnikov in vrednotenje interspecijskih križanj z vrsto *B. napus*

Genetska raznolikost genskega sklada referenčnih sort vrste *B. napus* in referenčnih sort njenih SKS-jev, ki se pojavljajo v Sloveniji, je na podlagi 15 markerjev znašala 0,692, kar pomeni, da je obravnavan genetski sklad zelo raznolik. Poleg tega smo v povprečju na vsakem lokusu določili 18,6 alela, kar je za 5,9 več kot na podlagi 45 markerjev znotraj genskega sklada referenčnih sort vrste *B. napus*. Kot najbolj informativni so se za razločitev obravnavanih genotipov izkazali mikrosatelitni markerji, ki so izolirani iz vrst *B. napus* in *B. nigra*, največje število alelov pa smo določili na lokusu Na12-C08. To je v nasprotju z rezultati študije Ellinga in sod. (2009), kjer se omenjeni lokus ni namnožil pri nobeni od vrst *B. rapa*, *R. raphanistrum*, *R. sativus*, *S. arvensis*, *S. alba* in *D. muralis*. Delež polimorfnihih lokusov je v naši analizi, opravljeni na podlagi 15 markerjev, znašal 82 %, kar je le malo manj kot v analizi referenčnih sort vrste *B. napus* (84 %), opravljeni na

podlagi 45 markerjev. Iz te minimalne razlike lahko sklepamo, da je za analizo genetske raznolikosti in analizo interspecijskih križanj vključenost izbranega seta 15 (izmed 45) mikrosatelitnih markerjev zelo ustrezna in dovolj informativna tudi na podlagi povprečne PIC-vrednosti (0,664). Da je obravnavani genetski sklad zelo raznolik, pričajo tudi nizke vrednosti fiksacijskih indeksov (Fis, Fit in Fst), prikazane v preglednici 12. Raznolikost obravnavanih sort je prikazana tudi na sliki 26, kjer filogenetsko drevo, izrisano na podlagi Ds- in UPGMA-algoritma, jasno ločuje SKS-je od predstavnikov vrste *B. napus*, razen da enega od staršev (*B. oleracea*) bolj uvršča med vrsto *B. napus* kot med SKS-je. Ta uvrstitev je zanimiva, saj spada v skupino nizko spolno kompatibilnih rastlin z vrsto *B. napus*. Če smo v filogenetskem drevesu tako obravnavane genotipe uvrstili v dve skupini, uvrstitev na podlagi Bayesove klastrske analize pa je genotipe znotraj genskega sklada vrste *B. napus* in referenčnih SKS-jev uvrstila v štiri genetske skupine, jih je tako razvrstila tudi FCA-analiza. Odstopanja v številu oblikovanih genetskih skupin so predvsem posledica različnih algoritmov razvrščanja na podlagi genetske raznolikosti znotraj obravnavanega seta podatkov. Tudi v tej analizi AMOVA smo izračunali negativno vrednost genetske variabilnosti znotraj referenčnih sort (−17,43 %), kar med drugim pomeni, da so vključeni genotipi istega izvora in da je panmiksija prisotna, kar potrjuje tudi negativna vrednost Fis, ki predstavlja genetsko raznolikost znotraj sort (Nolte in sod., 2005; Weber in sod., 1998).

Izračun prenosa genov in stopnje tujeprašnosti med vsemi referenčnimi genotipi na 15 lokusih ponazarja dejansko stanje prenosa genov v naravi, ki bi nastalo ob sobivanju sort vrste *B. napus* in sort njenih SKS-jev kot posevkov v času cvetenja vrste *B. napus*, in sicer brez kakršnih koli ovir za oprasitev. Tako bi stopnja prenosa genov na podlagi Barton-Slatkinove ocene znašala 0,525, pri čemer je povprečna frekvenca privatnih alelov 0,285. Ti dve vrednosti sta dejansko zelo nizki, praktično minimalni, kar potrjuje tudi druga ocena stopnje prenosa genov (Nm), za katero povprečna vrednost na obravnavanih lokusih znaša le 0,481, saj tako nizko vrednost Guo in sod. (2012) opredeljujejo kot minimalen potencial za prenos genov. Posledično je tudi stopnja tujeprašnosti referenčnih sort nizka, saj izračunana vrednost t krepko presega vrednost 1 in znaša 2,467, kar je tudi več kot znaša ista vrednost za referenčne sorte samo znotraj vrste *B. napus* ($t = 1,08$). Iz tega lahko sklepamo, da je stopnja interspecijskih oprasitev med posevki vrste *B. napus* in posevki njenih SKS-jev v Sloveniji v primeru sobivanja zanemarljiva.

Od vseh naštetih in opisanih SKS-jev vrste *B. napus* v točki 2.3.2 smo v času cvetenja oljne ogrščiće našli le vrsti, to je *B. rapa* in *S. arvensis*, ki se kot podivjani pojavljata v slovenskem pridelovalnem prostoru. Vrsta *B. rapa* spada od vseh SKS-jev, ki se pojavljajo pri nas, med najbolj spolno kompatibilne z vrsto *B. napus*, medtem ko vrsta *S. arvensis* spada med srednje spolno kompatibilne z vrsto *B. napus*, kar je opisano v točki 2.3.2 (preglednica 1). Njuno genetsko raznolikost smo analizirali z uporabo 45 markerjev. Ugotovili smo, da populacije vrste *S. arvensis* že skoraj ustrezajo opredelitvi naravne populacije in da je njena stopnja samoohranjanja v naravi zelo visoka, saj le na 19 lokusih te populacije ustrezajo zahtevam vrednosti HWE, na ostalih 26 lokusih pa ne. Tako stanje že odraža lastnosti, ki so značilne za samoohranjene populacije v naravi. Sicer je vrsta *S. arvensis* obravnavana kot enoletna rastlina, pa vendar je stopnja samoohranjanja teh rastlin glede na ta rezultat in pojavljanje v slovenskem pridelovalnem prostoru visoka. Visok potencial samoohranjanja vrste *S. arvensis* v primerjavi z vrsto *B. rapa* dokazuje tudi višja

stopnja genetske raznolikosti ($I = 1,607$, medtem ko je za *B. rapa* $I = 1,186$), ki odraža tudi višjo stopnjo prenosa genov in njihove ustalitve v populacijah vrste *S. arvensis* v naravi. Ugotovili smo namreč tudi višjo vrednost fiksacijskega indeksa kot pri vrsti *B. rapa* ($F = 0,258$), ki predstavlja tudi merilo ustalitve prenesenih genov v populacije. Poleg tega je tudi stopnja tujeprašnosti med populacijami vrste *S. arvensis* višja (41,1 %) kot med populacijami vrste *B. rapa* (18,3 %). Ti dve vrednosti predstavljata dejansko stopnjo prenosa genov v slovenskem pridelovalnem prostoru na podlagi štiriletnega spremljanja. Ob tem je treba omeniti, da je kontrola oprasitve pri vrsti *B. rapa* organizirana s SSI-stopnjo (Warwick 2003), pri vrsti *S. arvensis* pa določena SSI-stopnja prav tako obstaja (Stevens in Kay, 1989), vendar lahko na podlagi naših rezultatov sklepamo, da je nizka. Da se prek samoohranjanja populacij iz generacije v generacijo ohranjajo tudi mutacije na področju mikrosatelitnih regij (Hardy in sod., 2003), smo izračunali na podlagi razlike med analizo AMOVA glede na vrednosti F_{st} in R_{st} , kjer je bilo odstopanje med obema izračunoma molekulske variabilnosti med obema vrstama 2-odstotno. Ta vrednost bi lahko predstavljala prisotnost mutacij oziroma spomin preteklih mutacijskih dogodkov znotraj teh dveh vrst, ki se pojavljata v naravi na vseh 45 lokusih (Hardy in sod., 2003). Populaciji obeh vrst predstavljata višjo stopnjo genetske in geografske povezanosti v slovenskem pridelovalnem prostoru ($r_{xy} = 0,331$), kot smo jo izračunali za vse pojavne oblike vrste *B. napus* ($r_{xy} = -0,027$). Izračunana pozitivna vrednost r_{xy} kaže na to, da se znotraj določenega območja v Sloveniji pojavljajo genetsko bolj podobni genotipi, iz česar lahko zopet sklepamo, da se lahko samoohranjajo iz generacije v generacijo. Tako so v razporeditvi na podlagi PCoA-analize s 15 mikrosatelitnimi markerji vsi predstavniki vrste *S. arvensis* s terena v svoji skupini, ki je genetsko najbolj oddaljena od genotipov vrste *B. napus* in vseh njenih SKS-jev, medtem ko so predstavniki vrste *B. rapa* s terena vključeni v skupino genotipov SKS-jev.

Izmed vseh je najbolj orientacijska analiza interspecijskih križanj vrste med vsemi pojavnimi oblikami vrste *B. napus* in njenimi SKS-ji, ki smo jih zbrali na terenu v štirih letih na slovenskem pridelovalnem območju z uporabo 45 markerjev. V tej analizi smo v povprečju določili 18,7 alela na lokus, kar je najvišja vrednost ob prav tako najvišjem deležu polimorfnihih lokusov (94,4 %) do sedaj. Iz navedenega lahko sklepamo, da je informativnost rezultatov te analize ustrezna in verodostojna. Povprečna stopnja prenosa genov na podlagi Barton-Slatkinove ocene je bila nizka, saj je znašala 0,524, povprečna frekvenca privatnih alelov pa 0,285. Obe vrednosti sta primerljivi z vrednostmi, med katere sta vključeni le vrsti *B. rapa* in *S. arvensis*. Iz rezultatov, oblikovanih na podlagi izračunane rahlo negativne vrednosti fiksacijskega indeksa ($F = 1,135$) med vsemi tremi pojavnimi vrstami v naravi in posledično višje stopnje tujeprašnosti od 1 ($t = 1,135$), lahko sklepamo, da realno ni za pričakovati oprasitev in prenosa genov med pojavnimi oblikami vrst *B. napus*, *B. rapa* in *S. arvensis*. Torej lahko sklepamo, da v slovenskih pridelovalnih razmerah obstaja zanemarljiva možnost interspecijskih križanj vrste *B. napus* z njenimi SKS-ji, seveda ob predpostavki, da se ne pojavljajo kot posevki v primeru sobivanja, temveč kot točkovno pojavljajoče se populacije iz različnih habitatov. Ugotovili smo tudi, da so genetske razlike znotraj posamezne regije med genotipi najnižje tam, kjer je tudi prenos genov najnižji. Na podlagi vrednosti N_m smo spremljali tudi stopnjo ustalitve genov po posameznih letih znotraj iste regije in ugotovili, da je ta najvišji znotraj gorenjske in osrednjeslovenske regije, kjer je tudi obseg pridelave oljne ogrščiće dokaj visok (Pipan in sod., 2011). Med pojavnimi oblikami vseh treh vrst prav tako ni izražene genetske in

prostorske povezanosti (tako kot med pojavnimi oblikami vrst *B. rapa* in *S. arvensis*), kar se vidi tudi po razporeditvi genotipov v FCA-analizi na nivoju regij (slika 31). Prisotnost in ohranjanje mutacij v štiriletnem časovnem obdobju znotraj vrst *B. napus*, *B. rapa* in *S. arvensis* smo primerjali na podlagi skladnosti Fst- in Rst-matrik, kjer smo ugotovili, da te niso zanemarljive ($r_{xy} = 0,681$) že v štiriletnem časovnem obdobju; če bi alelne vzorce spremljali v še več zaporednih letih, pa bi zares lahko predvideli evolucijski vzorec spolno kompatibilnih populacij vrst *B. napus*, *B. rapa* in *S. arvensis*, ki se pojavljajo v slovenskem pridelovalnem prostoru, kar prav gotovo vključuje tudi gene, ki so se prek spontanih križanj ustalili v genomih teh treh vrst.

Časovno opredelitev interspeciesnega prenosa genov med vsemi pojavnimi oblikami vrste *B. napus* in njenimi SKS-ji, tudi referenčnimi, smo izračunali na podlagi 15 markerjev. Najvišjo Barton-Slatkinovo oceno stopnje prenosa genov smo izračunali v letih 2008 in 2010 (preglednica 14), verjetno na račun vključenosti populacij vrst *B. rapa* in *S. arvensis* s terena. Zaradi prisotnosti velikega števila referenčnih genotipov sort vrste *B. napus* in njenih SKS-jev so pri vseh letih fiksacijski indeksi negativni in stopnje tujeprašnosti visoke (nad 1), zato s takim naborom genotipov stopnje prenosa genov ni realno ocenjevati. Če pa gledamo s stališča pridelovalca posevka oljne ogrščice na nivoju celotnega slovenskega pridelovalnega prostora, pa te vrednosti odražajo dejansko stanje. Posevki, ki so v naravi zastopani na večjih površinah, in posamezne rastline iste ali spolno kompatibilne vrste, ki se nahajajo v bližini tega posevka, zasenčijo oziroma prekrijejo oprašitve, ki se zgodijo v smeri pojavnega oblika–posevek, ker je možnost oprašitve večja, če je površina donorja večja od površine recipienta (Treu in Emberlin, 2000). Tako so v tem primeru veliko bolj informativni in za naše razmere realni rezultati analize AMOVA, kjer lahko vidimo, da se genetska raznolikost znotraj pojavnih oblik iz leta v leto povečuje (preglednica 15), repertoar referenčnih genotipov vrste *B. napus* in njenih referenčnih SKS-jev pa ostaja vsako leto enak. Tak trend zares odraža dejansko stanje prenosa in ustalitve genov v naravnih populacijah v slovenskem pridelovalnem prostoru iz generacije v generacijo, torej v štirih zaporednih generacijah. Te rezultate potrjujejo tudi iz leta v leto naraščajoče vrednosti privatnih alelov, iz česar lahko sklepamo predvsem na ustalitev prenesenih genov v genome samoohranjenih rastlin vrste *B. napus*. Poleg tega smo te ugotovitve podprli tudi z izračunom stopnje tujeprašnosti med vsemi tremi pojavnimi oblikami, ki smo jih zbrali na terenu (brez referenčnih sort vrste *B. napus* in njenih SKS-jev); vrednost t je namreč znašala 0,912, kar pomeni 8,8-odstotno stopnjo tujeprašnosti v štiriletnem časovnem obdobju. Ta vrednost pa odraža dejansko stopnjo tujeprašnosti in s tem potencial za intra- in interspeciesni prenos genov prek spontanega križanja vseh pojavnih oblik vrste *B. napus* znotraj družine Brassicaceae (brez referenčnih sort) v slovenskem pridelovalnem prostoru, saj zaradi vključenosti podivjanih populacij (ki lahko vključujejo gene drugih SKS-jev) dejansko ne moremo opredeliti, da bi to lahko bila le intraspeciesna križanja. Ob tem je pomembno omeniti tudi stopnjo ustalitve prenesenih genov v naravne populacije prek spontanega križanja. Na podlagi naših rezultatov je bila izračunana vrednost Fst, ki predstavlja tudi merilo za ustalitev prenesenih genov (Pearse in Crandall, 2004), ki je bila v obdobju 2007–2010 najvišja poleg že omenjene najvišje vrednosti števila privatnih alelov v letu 2010. Pomembnost predvsem interspeciesnega križanja vrste *B. napus* z njenimi SKS-ji izpostavlja Siemens (2002), ki navaja možnost vnosa novih lastnosti na odpornost glivičnih bolezni v genetski sklad vrste *B. napus* prek medvrstnega križanja. Nosilke genov za odpornost na glivične bolezni (*Leptosphaeria maculans*, *Alternaria brassicola*, *A. raphani*

in *Plasmodiphora brassicae*) naj bi bile divje rastoče vrste *D. tenuifolia*, *H. incana* in *S. arvensis*.

5.1.6 Analiza prisotnosti gensko spremenjenih organizmov

Z razvojem biotehnoloških metod so klasične metode žlahtnjenja dopolnile metode genskega inženiringa tudi pri oljni ogrščici, kar pomeni potencialno tveganje za vnos gensko spremenjenih organizmov v slovenski pridelovalni prostor. Ker je bil v Sloveniji Zakon o soobstoju gensko spremenjenih rastlin z ostalimi kmetijskimi rastlinami sprejet v letu 2009, smo pregled prisotnosti gensko spremenjene vrste *B. napus* omejili na samosevne in podivjane populacije iz let 2007 in 2008, vzorčenje ob koncu transportnih poti pa na leto 2008 (pridelek jesenske setve leta 2007), saj nikjer nismo pričakovali pozitivnih rezultatov. Glede na rezultate lahko ugotovimo, da bi bila zadostna in predvsem zadosti natančna za določitev gensko spremenjenih organizmov vrste *B. napus* že kvalitativna PCR-analiza, kljub temu da smo analizo opravljali z združenimi vzorci. V kvalitativni PCR-analizi smo uspešno namnožitev genskega konstrukta RT/GT73 določili tudi v vzorcu, kjer smo listni material pripravili z naslednjim razmerjem: gensko spremenjena : gensko spremenjena oljna ogrščica RT/GT73 = 1 : 50 pri vseh desetih ponovitvah (slika 38).

V primeru pozitivnega rezultata za genetski element 35S bi lahko ta pomenil tudi lažno pozitiven rezultat, saj 35S-promoter izvira iz CaMV-ja, ki lahko okuži tudi sorodne rastline iz družine Brassicaceae, med njimi tudi oljno ogrščico. Tako bi morali za isti genski element izvesti še dodatno preverjanje, če pozitiven rezultat pomeni prisotnost 35S-promoterja, ki izvira iz gensko spremenjenih organizmov, ali če je katera izmed rastlin, ki sestavlja vzorec, okužena s CaMV-jem (Chaouachi in sod., 2007).

Pri kvalitativni PCR-analizi in z uporabo Q-PCR-analize smo dobili identične rezultate, saj so bili vsi analizirani vzorci za vse štiri genske elemente po pričakovanih negativni. Če bi bil kateri izmed vzorcev pozitiven, pa bi z uporabo Q-PCR-analize lahko kvantificirali delež gensko spremenjenih organizmov v vzorcu. Podoben postopek monitoringa gensko spremenjene vrste *B. napus* so uporabili v Franciji, kjer so analizirali vzorce iz pridelovalnega območja walonske regije (Hanna, 2007).

5.2 SKLEPI

Prostorski obseg, štiriletno časovno spremljanje in vključenost 80 referenčnih genotipov vrste *B. napus* in njenih SKS-jev, ki pravzaprav zajema dejansko genetsko raznolikost na nacionalnem nivoju, ni bilo objavljeno še v nobeni študiji. Rezultati doktorske disertacije so tako odraz dejanskega stanja, to je možnosti spontanega oprašitev, ki se dogajajo v naravi na pridelovalnem območju Slovenije. Poleg tega doktorska disertacija zajema tudi pregled prisotnosti gensko spremenjenih rastlin vrste *B. napus* v Sloveniji do uvedbe Zakona o soobstoju gensko spremenjenih rastlin z ostalimi kmetijskimi rastlinami (2009).

Rezultate doktorske disertacije lahko povzamemo v naslednjih sklepih:

- največ samosevnih in podivjanih populacij vrste *B. napus* smo v štiriletnem časovnem obdobju zbrali znotraj tistih statističnih regij, v katerih se oljna ogrščica

prideluje v največjem obsegu. To je znotraj osrednjeslovenske, savinjske in pomurske regije ter regije jugovzhodna Slovenija, prav tako pa tudi na območju gorenjske regije;

- majhen obseg zbranih samosevnih rastlin v štiriletnem časovnem obdobju (66) v primerjavi z obsegom podivjanih populacij (195) odraža ozaveščenost in seznanjenost pridelovalcev oljne ogrščice z agrotehničnimi ukrepi, ki preprečujejo prisotnost samosevnih rastlin znotraj pridelovalnih površin in s tem omogočajo izvajanje dobre kmetijske prakse;
- potrdili smo, da je tudi za slovenski pridelovalni prostor značilna nepredvidljiva dinamika pojavljanja rastlin, ki vzkljujejo iz semena, shranjenega v talni semenski banki. Izmed vseh 260 lokacij, na katerih smo po celotni Sloveniji vzorčili v štirih letih, smo le na devetih lokacijah v istem časovnem obdobju vzorčili več kot enkrat. To pomeni, da je lokalno (točkovno) samoohranjanje različnih pojavnih oblik vrste *B. napus* redko in da v slovenskih razmerah pridelave ne presega 3,5-odstotnega deleža. Iz tega lahko med drugim sklepamo, da ostalih 96,5 % pojavnih oblik vrste *B. napus* iz različnih habitatov izvira iz ohranjenega semena v talni semenski banki in izhaja iz premeščanja semena iz sosednjih pridelovalnih površin, in to predvsem prek transporta v času žetve;
- izmed vseh SKS-jev vrste *B. napus* iz družine Brassicaceae, ki se pojavljajo v slovenskem pridelovalnem prostoru, smo v času cvetenja oljne ogrščice našli le dve vrsti: vrsto *B. rapa*, ki predstavlja visoko spolno kompatibilnost, in vrsto *S. arvensis*, ki predstavlja srednjo spolno kompatibilnost z vrsto *B. napus*. Na podlagi izračunanih vrednosti HWE za obe vrsti sklepamo, da se populacije vrste *S. arvensis* že dlje časa lahko samoohranjajo v naravi prek talne semenske banke, saj je na 26 lokusih (izmed skupno 45) njihovo odstopanje od vrednosti HWE statistično značilno ($p < 0,05$). Tako stanje pa že odraža lastnosti naravnih populacij;
- največ lastnosti, ki odražajo karakteristike samoohranjenih populacij, imajo na podlagi izračuna vrednosti HWE podivjane populacije vrste *B. napus*, saj je na vseh 45 lokusih njihovo odstopanje od vrednosti HWE statistično značilno ($p < 0,05$);
- genetska raznolikost genskega sklada referenčnih sort vrste *B. napus*, ki so se od leta 1984 do leta 2010 pridelovale v slovenskem pridelovalnem prostoru, je visoka in na podlagi vrednosti H_e na 45 lokusih znaša 0,654. Ugotovili smo tudi, da je na podlagi visoke PIC-vrednosti (0,618) izbrani set mikrosatelitnih markerjev zelo informativen in ustrezen, saj gre za ločevanje genotipov na nivoju iste vrste;
- genetska raznolikost genskega sklada referenčnih sort SKS-jev vrste *B. napus*, ki se pojavljajo v slovenskem pridelovalnem prostoru, na podlagi vrednosti H_e na 15 lokusih znaša 0,692. Izračunana vrednost vrednosti polimorfizma izbranega seta mikrosatelitnih markerjev za analizo genetske raznolikosti SKS-ja vrste *B. napus* znaša 0,664, iz česar sklepamo na ustrezno izbiro, ki nam poda zelo informativne rezultate, ki bi lahko bili uporabni predvsem pri analizah sortne čistosti semena ekonomsko pomembnih predstavnikov vrste iz družine Brassicaceae;
- ugotovili smo tudi, da so samosevne ($H_e = 0,72$, $I = 1,73$, $N_p = 3,07$) in podivjane ($H_e = 0,69$, $I = 1,71$, $N_p = 4,60$) populacije genetsko bolj raznolike kot referenčne sorte ($H_e = 0,66$, $I = 1,51$, $N_p = 3,76$) vrste *B. napus*. Na podlagi teh izračunov lahko sklepamo, da se je, ko je prišlo do spontanega oprašitve posevkov v naravi, ki so se v naslednjem letu pojavljale kot samosevne rastline, ki smo jih vzorčili, vsa

- genetska raznolikost pokazala v tem letu (zato sta vrednosti H_e in I znotraj samosevnih populacij najvišji), ni pa še prišlo do ustalitve prenesenih genov v genome takratnih samosevnih rastlin. Z večletnim samoohranjanjem semena teh rastlin zunaj pridelovalnih površin in s pojavnostjo teh rastlin v naravi pa so se nekateri preneseni geni le ustalili v genomih sedaj že podivjanih populacij (najvišja vrednost N_p), kar smo potrdili tudi z izračunom najvišje vrednosti števila različnih alelov znotraj podivjanih populacij (15,67) v slovenskem pridelovalnem prostoru;
- časovno spremljanje prenosa genov na podlagi zaporednega naraščajočega števila privatnih alelov, vrednosti F_{st} in molekulske variance v obdobju 2007–2010 znotraj samosevnih in podivjanih oblik vrste *B. napus* ter njenih SKS-jev, ki se pojavljajo v slovenskem pridelovalnem prostoru (vrsti *B. rapa* in *S. arvensis*), dokazuje, da je ustalitev in ohranjanje prenesenih genov v genome samoohranjenih rastlin prek spontanega intra- in interspecijskih križanj v naravi možna. Trend povečanja privatnih alelov iz generacije v generacijo pa nakazuje na prisotnost nespecifičnih alelnih oblik v genomih teh rastlin iz različnih habitatov v slovenskem pridelovalnem prostoru;
 - glede na odstopanja med rezultati analize AMOVA na podlagi F-statistike, ki upošteva nedoločen alelni model v primeru alelne enakosti oziroma različnosti (F_{st}), in na podlagi stopenjskega mutacijskega modela, ki upošteva varianco v dolžinah alelov (R_{st}) pri pojavnih oblikah vrst *B. napus*, *S. arvensis* in *B. rapa*, zbranih na terenu, lahko sklepamo na prisotnost mutacij znotraj obravnavanih mikrosatelitnih regij v genomih teh treh vrst. Samoohranjanje teh populacij v naravi pa posledično pomeni tudi vpliv na evolucijo teh treh vrst skozi čas;
 - prostorska in genetska povezanost med pojavnimi oblikami znotraj vrste *B. napus* ter med vrstama *B. rapa* in *S. arvensis*, ki so bile zbrane v štiriletnem časovnem obdobju na terenu, je bila višja med vrstama *B. rapa* in *S. arvensis* ($r_{xy} = 0,331$, $p = 0,01$). Na podlagi izračunane vrednosti r_{xy} lahko sklepamo, da se vseeno znotraj nekega območja v Sloveniji pojavljajo genetsko bolj podobni genotipi, iz česar sledi, da se lahko samoohranjajo iz generacije v generacijo. Tako so v razporeditvi na podlagi PCoA-analize s 15 mikrosatelitnimi markerji tudi vsi predstavniki vrste *S. arvensis* s terena v svoji skupini, ki je genetsko najbolj oddaljena od genotipov vrste *B. napus* in vseh njenih SKS-jev, medtem ko so predstavniki vrste *B. rapa* s terena vključeni v skupino genotipov SKS-jev;
 - na podlagi nizkega koeficienta skladnosti genetske in geografske matrike za vse pojavne oblike znotraj vrste *B. napus* v slovenskem pridelovalnem prostoru ($r_{xy} = -0,027$, $p = 0,01$) lahko sklepamo, da so si genotipi znotraj različnih regij v obravnavanem časovnem obdobju genetsko zelo podobni (6- oziroma 10-odstotni delež variabilnosti ter nizki vrednosti F_{st} in R_{st} znotraj posamezne regije) in da so vsi v vseh regijah ter v vseh letih enako zastopani. Prav zato ni za pričakovati visoke genetske in prostorske povezanosti med vsemi pojavnimi oblikami vrste *B. napus* v naravnih habitatih. Na podlagi izračunane višje skladnosti geografske in genetske matrike samo podivjanih genotipov vrste *B. napus* v Sloveniji ($r_{xy} = 0,044$, $p=0,01$) pa lahko sklepamo, da so se tiste podivjane rastline, ki so rasle blizu druga drugi, med sabo opraševale in se iz generacije v generacijo samoohranjale ter si tako postajale genetsko vedno bolj podobne;
 - stopnja tujeprašnosti, ki pomeni potencial za prenos genov prek spontanega inter- in intraspecijskih križanj vrste *B. napus* in njenih SKS-jev iz družine Brassicaceae v

slovenskem pridelovalnem prostoru, na osnovi štiriletnega spremljanja znaša v povprečju 8,8 %;

- ugotovili smo tudi, da v nobeni izmed analiz ni bilo jasno izraženega vzorca, da bi izvor mikrosatelita (iz katere vrste izhaja) ali njegova struktura vplivala na njegovo informacijsko vrednost;
- zaključimo lahko, da je genotipizacija vrste *B. napus* in njenih SKS-jev znotraj družine Brassicaceae na podlagi obdelave rezultatov o natančno določenih dolžinah alelov istega lokusa na 2n-nivoju ustrezna. Ta predstavlja optimalen kompromis glede na genetski izvor obravnavanih genotipov ter razpoložljivost računalniških programov za statistično obdelavo rezultatov in parametrov populacijske genetike, ki omogočajo tudi ocene stopenj prenosa in ustalitve genov v naravi prek spontanega križanja. Primerjalno še več genetske informacije zajame obdelava rezultatov o natančno določenih dolžinah alelov istega lokusa na 4n-nivoju. Če pa genotipizacija poteka na podlagi vhodnih binarnih matrik na 4n-nivoju, je ta primerna le za genotipizacijo referenčnih sort vrste *B. napus*. Genotipizacija na podlagi vhodnih binarnih matrik na 2n-nivoju pa se je v tem primeru izkazala za najmanj primerno;
- rezultati analize prisotnosti gensko spremenjenih organizmov vrste *B. napus* z metodo kvalitativne PCR-analize in Q-PCR-analize, opravljene na štirih presejalnih genskih elementih (bar, EPSPS, p35S in tNOS), so bili za vse analizirane združene vzorce po pričakovanjih negativni. Iz tega lahko sklepamo, da v tem obdobju v slovenskem pridelovalnem prostoru ni prišlo do nenamerne prisotnosti gensko spremenjenih organizmov.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Brassica napus L. je vsesplošno uporabna rastlina, ki spada v raznoliko družino Brassicaceae (križnic). Vrsta vključuje dve po namenu pridelave precej različni podvrsti. Prva podvrsta obsega zelenjadne predstavnike, med njimi pomembno podzemno (rumeno) kolerabo (*B. napus* L. subsp. *napobrassica* (L.) Hanelt), druga podvrsta (*B. napus* L. subsp. *napus* L.) pa združuje ozimno ter jaro in oljno ter krmno obliko navadne ogrščice. V osnovi je *B. napus* samoprašna rastlinska vrsta z variabilno stopnjo tujeprašnosti, ki je pogojena z vplivi iz okolja. *B. napus* je kot amfidiploidna rastlinska vrsta nastala z medvrstnim križanjem med repo (*B. rapa* L.; AA-genom, $2n = 20$) in zeljem (*B. oleracea* L.; CC-genom, $2n = 18$). Zaradi variabilne stopnje tujeprašnosti v naravi lahko prihaja do intraspeciesnega prenosa genov vrste *B. napus*, in sicer med rastlinami različnih habitatov (posevki, samosevne rastline znotraj pridelovalnih površin in med podivjanimi populacijami zunaj pridelovalnih površin). Oprašitev vrste *B. napus* je mogoča tudi z njenimi spolno kompatibilnimi sorodniki (SKS) iz drugih rodov in vrst iz družine Brassicaceae (interspeciesna križanja). Sposobnost križanja z vrsto *B. napus*, ki se pojavlja v Sloveniji, imajo predvsem *B. nigra* L., *B. rapa* (*B. campestris* L.), *B. oleracea*, *Diplotaxis muralis* (L.) DC., *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC., *Sinapis alba* L., *Sinapis arvensis* L. (*B. kaber* (D.) LC. Wheeler), *Raphanus raphanistrum* L. *Raphanus sativus* L. in *Rapistrum rugosum* (L.) All. Njihova prisotnost v naravi lahko omogoči prenos genov preko spontanega intra- in interspeciesnega križanja v naravi, seveda ob hkratni izpolnitvi dejavnikov, ki pogojujejo prenos peloda. Obstaja tudi možnost introdukcije gensko spremenjenih genotipov vrste *B. napus* v slovenske sisteme pridelave, ki bi posledično v pridelovalni prostor prinesla nove opraševalne vire s transgenimi lastnostmi. Z uporabo molekularskih markerjev, med njimi mikrosatelitnih markerjev ali SSR-jev (angl. Simple Sequence Repeats), je na podlagi prostorske in časovne komponente mogoče analizirati genetske profile in spremembe v alelni strukturi obravnavanih genotipov na nivoju DNA.

Prisotnost pojavnih oblik vrste *B. napus* in njenih SKS-jev v različnih habitatih smo predvideli znotraj statističnih regij, kjer se oljna ogrščica največ prideluje, ob transportni infrastrukturi in na lokacijah, kjer lahko prihaja do premeščanja in nenadzorovanega raztrosa. V času cvetenja oljne ogrščice je v obdobju 2007–2010 potekalo vzorčenje na območju celotne Slovenije. Vzorčili smo mlade liste rastlin. Sočasno smo v letu 2008 zbirali tudi zrnje pridelka pridelovalcev oljne ogrščice. Podatke in seme referenčnih sort vrste *B. napus*, ki se je v obdobju 1984–2010 pridelovala na območju Slovenije, ter referenčne sorte SKS-jev, ki se pojavljajo pri nas, smo zbirali prek različnih nacionalnih virov in genskih bank. Iz njihovega semena smo vzgojili mlade rastlinice. Iz združenih rastlinskih vzorcev smo izolirali DNA. Za genetsko identifikacijo smo uporabili mikrosatelitne markerje z različnimi strukturami ponavljajočega se motiva in izolirane iz genomov sorodnih vrst. Za analizo genetske raznolikosti referenčnih genotipov SKS-jev smo v PCR-postopek izmed 45 vključili set 15 markerjev. Zelena zaporedja smo v skupnem volumnu 11,5 μ l namnoževali v PCR-analizi po štirih različnih PCR-protokolih z ustreznimi temperaturnimi nastavitvami za posamezen par začetnih oligonukleotidov, ki smo jih v procesu sinteze modificirali z 18 bp dolgim M13(-21)-zaporedjem, saj smo uporabili ekonomično metodo z uporabo univerzalnega začetnega oligonukleotida s

fluorescentnimi repi. Na podlagi združenih PCR-postproduktov (treh fluorescentnih oznak FAM, NED in HEX) smo natančne dolžine alelov določili v fragmentni analizi na genetskem analizatorju ABI3130 (ABI), in sicer ob uporabi dolžinskega standarda alelnih dolžin – ROX-350 (ABI). Branje rezultatov na 2n- in 4n-nivoju smo izvedli v programu GenScan4.0 (ABI). Obdelavo in prikaz rezultatov genetske analize na 2n- in 4n-nivoju smo izvedli v različnih statističnih programih in programskih paketih za vrednotenje populacijske genetske raznolikosti in strukture (Arlequin 3.5.1.2, FreeTree, Fstat 2.9.3.2, GenAlEx 6.4.1, GenePop 4.1.0, Genetix, Identity 1.0, Microsatellite Toolkit, Populations, Structure 2.3.3 in TreeView). Za določanje prisotnosti gensko spremenjene oljne ogršče smo izvedli presejalno analizo za štiri genske elemente (bar, EPSPS, p35S in tNOS) z uporabo optimiziranih PCR-protokolov s kvalitativno PCR-analizo in PCR-analizo v realnem času.

Največ samosevnih in podivjanih populacij vrste *B. napus* smo v štiriletnem časovnem obdobju zbrali znotraj tistih statističnih regij, v katerih se tudi oljna ogršča prideluje v največjem obsegu, to je znotraj osrednjeslovenske, savinjske, in pomurske regije ter regije jugovzhodna Slovenija, prav tako pa tudi na območju gorenjske regije. Potrdili smo tudi, da je za slovenski pridelovalni prostor značilna nepredvidljiva dinamika pojavljanja rastlin, ki vzkljujejo iz semena, shranjenega v talni semenski banki. To pomeni, da je lokalno (točkovno) samoohranjanje različnih pojavnih oblik vrste *B. napus* redko in da v slovenskih razmerah pridelave ne presega 3,5-odstotnega delež. Izmed vseh SKS-jev vrste *B. napus* iz družine Brassicaceae, ki se pojavljajo v slovenskem pridelovalnem prostoru, smo v času cvetenja oljne ogršče našli le dve vrsti, to je *B. rapa* in *S. arvensis*. Na podlagi izračunanih vrednosti HWE (angl. Hardy Weinberg Equilibrium) lahko za obe vrsti sklepamo, da se populacije vrste *S. arvensis* že dlje časa samoohranjajo v naravi prek talne semenske banke, saj je na 26 lokusih njihovo odstopanje od vrednosti HWE statistično značilno ($p < 0,05$). Največ lastnosti, ki odražajo karakteristike samoohranjenih populacij, imajo podivjane populacije vrste *B. napus*, saj je na vseh lokusih njihovo odstopanje od vrednosti HWE statistično značilno ($p < 0,05$).

Genetska raznolikost genskega sklada referenčnih sort vrste *B. napus*, ki se je od leta 1984 do leta 2010 pridelovala v slovenskem pridelovalnem prostoru, je visoka in znaša 0,654. Ugotovili smo tudi, da je na podlagi visoke vrednosti PIC (0,618) izbrani set mikrosatelitnih markerjev zelo informativen in ustrezen, saj gre za ločevanje genotipov na nivoju iste vrste. Genetska raznolikost genskega sklada referenčnih sort SKS-jev vrste *B. napus*, ki se pojavljajo v slovenskem pridelovalnem prostoru, znaša 0,692. Izračunana vrednost vrednosti polimorfizma izbranega seta mikrosatelitnih markerjev za analizo genetske raznolikosti SKS-jev vrste *B. napus* je 0,664, iz česar sklepamo na ustrezno izbiro, ki nam poda zelo informativne rezultate, ki bi lahko bili uporabni predvsem pri analizah sortne čistosti semena ekonomsko pomembnih predstavnikov vrste iz družine Brassicaceae. Ugotovili smo tudi, da so samosevne ($H_e = 0,72$, $I = 1,73$, $N_p = 3,07$) in podivjane ($H_e = 0,69$, $I = 1,71$, $N_p = 4,60$) populacije genetsko bolj raznolike kot referenčne sorte ($H_e = 0,66$, $I = 1,51$, $N_p = 3,76$) vrste *B. napus*. Na podlagi teh izračunov lahko sklepamo, da se je, ko je prišlo do spontanega oprašitev posevkov v naravi, ki so se v naslednjem letu pojavljali kot samosevne rastline, ki smo jih vzorčili, vsa genetska raznolikost v tem letu izrazila (zato sta vrednosti H_e in I znotraj samosevnih populacij najvišji), ni pa še prišlo do ustalitve prenesenih genov v genome takratnih samosevnih

rastlin. Z večletnim samoohranjanjem semena teh rastlin zunaj pridelovalnih površin in pojavnosti teh rastlin v naravi pa so se nekateri preneseni geni le ustalili v genomih sedaj podivjanih populacij v slovenskem pridelovalnem prostoru. Časovno spremljanje prenosa genov na podlagi zaporednega naraščajočega števila privatnih alelov, vrednosti F_{st} in molekulske variance v obdobju 2007–2010 znotraj samosevnih in podivjanih oblik vrste *B. napus* in njenih SKS-jev, ki se pojavljajo v slovenskem pridelovalnem prostoru (vrsti *B. rapa* in *S. arvensis*), dokazuje, da je ustalitev in ohranjanje prenesenih genov v genome samoohranjenih rastlin prek spontanega intra- in interspeciestnih križanj v naravi možna. Prostorska in genetska povezanost med pojavnimi oblikami znotraj vrste *B. napus* ter med vrstama *B. rapa* in *S. arvensis*, ki so bile zbrane v štiriletnem časovnem obdobju na terenu, je bila višja med vrstama *B. rapa* in *S. arvensis* ($r_{xy} = 0,331$, $p = 0,01$). Na podlagi izračunane vrednosti r_{xy} lahko sklepamo, da se znotraj nekega območja v Sloveniji vseeno pojavljajo genetsko bolj podobni genotipi, iz česar sledi, da se lahko samoohranjajo iz generacije v generacijo. Tako so v razporeditvi na podlagi PCoA-analize na 15 lokusih tudi vsi predstavniki vrste *S. arvensis* s terena v svoji skupini, ki je genetsko najbolj oddaljena od genotipov vrste *B. napus* in vseh njenih SKS-jev, medtem ko so predstavniki vrste *B. rapa* s terena vključeni v skupino genotipov SKS-jev. Na podlagi nizkega koeficienta skladnosti genetske in geografske matrike za vse pojavne oblike znotraj vrste *B. napus* v slovenskem pridelovalnem prostoru ($r_{xy} = -0,027$, $p = 0,01$) lahko sklepamo, da so si v splošnem genotipi znotraj različnih regij v obravnavanem časovnem obdobju genetsko zelo podobni (6- oziroma 10-odstotni delež variabilnosti ter nizki vrednosti F_{st} in R_{st} znotraj posamezne regije) ter da so vsi v vseh regijah in v vseh letih nekako enako zastopani. Prav zato ni za pričakovati visoke genetske in prostorske povezanosti med vsemi pojavnimi oblikami vrste *B. napus* v naravnih habitatih. Na podlagi izračunane višje skladnosti geografske in genetske matrike samo podivjanih genotipov vrste *B. napus* v Sloveniji ($r_{xy} = 0,044$, $p = 0,01$) pa lahko sklepamo, da so tiste podivjane rastline, ki so rasle blizu druga drugi, med sabo opraševale in se iz generacije v generacijo samoohranjale ter si tako postajale tudi genetsko vedno bolj podobne. Stopnja tujeprašnosti, ki pomeni potencial za prenos genov prek spontanega inter- in intraspeciestnih križanj vrste *B. napus* in njenih SKS-jev iz družine Brassicaceae, v slovenskem pridelovalnem prostoru na osnovi štiriletnega spremljanja znaša 8,8 %.

Ugotovili smo tudi, da v nobeni izmed analiz ni bilo jasno izraženega vzorca, da bi izvor mikrosatelita (iz katere vrste izhaja) ali njegova struktura vplivala na njegovo informacijsko vrednost. Zaključimo lahko, da je genotipizacija vrste *B. napus* in njenih SKS-jev znotraj družine Brassicaceae na podlagi obdelave rezultatov o natančno določenih dolžinah alelov istega lokusa na 2n-nivoju ustrezna. Ta predstavlja optimalen kompromis glede na genetski izvor obravnavanih genotipov ter razpoložljivost računalniških programov za statistično obdelavo rezultatov in parametrov populacijske genetike, ki omogočajo tudi ocene stopenj prenosa in ustalitve genov v naravi prek spontanega križanja. Primerjalno še več genetske informacije zajame obdelava rezultatov o natančno določenih dolžinah alelov istega lokusa na 4n-nivoju.

Rezultati analize prisotnosti gensko spremenjenih organizmov vrste *B. napus* z metodama kvalitativne PCR-analize in Q-PCR-analize na štirih presejalnih genskih elementih (bar, EPSPS, p35S in tNOS) so bili za vse analizirane združene vzorce po pričakovanjih

negativni. Iz tega lahko sklepamo, da v tem obdobju v slovenskem pridelovalnem prostoru ni prišlo do nenamerne prisotnosti gensko spremenjenih organizmov.

Analiza genetske raznolikosti vrste *B. napus* in njenih SKS-jev ter ugotavljanje prenosa genov prek spontanih oprašitev v Sloveniji je bila zasnovana na podlagi časovne in prostorske dimenzije. Želeli smo, da so rezultati odraz dejanskega stanja opraševalnih zmožnosti vrste *B. napus* znotraj družine Brassicaceae v slovenskem pridelovalnem prostoru.

6.2 SUMMARY

Brassica napus L. is widely useful plant which belongs to a diverse Brassicaceae (cruciferous) family. Species includes two different subspecies. The first group comprises vegetable forms including swedes (*B. napus* L. subsp. *napobrassica* (L.) Hanelt), the other combines winter and spring oil, and fodder forms of rapeseed (*B. napus* L. subsp. *napus* L.). *B. napus* is self-pollinated plant species with a variable out-crossing rate, influenced by the environment. *B. napus* is a amphidiploid plant species derived from inter-specific hybridization between turnip (*B. rapa* L., genome AA, $2n = 20$) and cabbage (*B. oleracea* L., CC genome, $2n = 18$). Due to the variable out-crossing rate, intra-specific gene flow between *B. napus* forms from different habitats (cultivated, volunteers within the field and feral populations outside cultivated areas) may occur in nature. Pollination with *B. napus* is also possible with its sexually compatible relatives (SKR) from other genera and with the other Brassicaceae family species (inter-specific hybridization). Spontaneous crosses with *B. napus* forms, occurring in Slovenian production area, are formed by *B. nigra* L., *B. rapa* (*B. campestris* L.), *B. oleracea*, *Diplotaxis muralis* (L.) DC., *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC., *Sinapis alba* L., *Sinapis arvensis* L. (*B. kaber* (D) LC. Wheeler), *Raphanus raphanistrum* L., *R. sativus* L. and *Rapistrum rugosum* (L.) All. Their presence in nature allows gene flow via spontaneous intra and inter-specific pollination in nature, when conditions affecting pollen transfer are fulfilled. There is also possibility of introduction of genetically modified (GM) genotypes of *B. napus* into Slovenian production area, which would result in new sources of transgenes with a pollinating potential. Molecular markers, microsatellite markers or SSR's (Simple Sequence Repeats) could be used to analyse the genetic profiles and changes in the allelic structure of the genotypes on the DNA level on the basis of spatial and temporal component.

We have predicted occurrence of different *B. napus* and its SKR forms from different habitats within the region, where oilseed rape is widely cultivated, at the transport infrastructure and on locations with uncontrolled movements, loading and unloading and distribution of rape seed. During the flowering time of oilseed rape, a field survey within Slovenian production area was performed from 2007 to 2010 and young leaves of *B. napus* and its SKR were sampled. In 2008 we collected in addition the seed samples of harvested oilseed rape from various producers. Information and reference seeds from *B. napus* varieties, which were grown in the period of 1984 to 2010 in Slovenia and reference SKS varieties that occur in our country were acquired through various sources and national gene banks. From acquired seeds of reference material, we raised young plants. Bulks were prepared from plant material and subsequently DNA was isolated. For genetic identification, we used microsatellite markers, with different structures and repeat motifs

isolated from related species. To analyze the genetic diversity of SKS reference genotypes using PCR (polymerase chain reaction) procedure, 15 loci from the set of 45 were included. PCR amplification was performed in a 11.5 µl total volume after 4 different touchdown PCR protocols with optimal temperature settings for each pair of primers, which were in the process of synthesis modified with 18-bp M13 (-21) sequence. Using bulked post-PCR products (three fluorescent labels FAM, HEX and NED) we have determined the exact allele lengths on the basis of fragment analysis using length standard, ROX-350 (ABI) and the ABI3130 genetic analyzer (ABI). Reading of the results on the diploid and tetraploid level was performed by GenScan4.0 (ABI). Processing and presentation of the genetic analysis results on diploid and tetraploid level was carried out in various statistical software packages and programs for the evaluation of genetic diversity and population structure (Arlequin 3.5.1.2, FreeTree, Fstat 2.9.3.2, GenAlEx 6.4.1, GenePop 4.1.0, Genetix, Identity 1.0, Microsatellite Toolkit-populations, Structure 2.3.3 and TreeView). To determine the presence of GM rapeseed, screening analysis was performed for four genetic elements, bar, EPSPS, P35S and tNOS using optimized PCR protocols with qualitative PCR analysis and real time (RT)-PCR analysis.

Most volunteer and feral populations of *B. napus* collected during the four-year period were found within regions where the oilseed rape is widely grown; Osrednje-slovenska region, Savinjska region, Pomurska region, Jugovzhodna Slovenia and the Gorenjska region. We have confirmed that the Slovenian production area is characterized by the unpredictable dynamics of plants appearing from soil seed bank. In other words, the local self-recruited forms of *B. napus* are rare and their appearance in the Slovenian production area does not exceed 3.5%. From all of the SKS occurring in Slovenia, only *B. rapa* and *S. arvensis* were found during the flowering period of oilseed rape. The calculated values of HWE (Hardy Wienberg Equilibrium) for both species suggest that populations of *S. arvensis* are long-term self-recruited in nature through the soil seed bank, which is confirmed through statistically significant deviation from HWE ($p < 0.05$) for the 26 loci. Significantly more attributes, that reflect the characteristics of self-recruited populations have feral populations of *B. napus*, with statistically significant deviation from HWE ($p < 0.05$) for all analyzed loci.

Genetic diversity of *B. napus* reference varieties (cultivated from 1984 to 2010) within the Slovenian production area is high (0.654). We have also found that selected set of microsatellite markers is highly informative and relevant for genetic differentiation between genotypes within the same species, on the basis of high PIC values (0.618). Genetic diversity of the SKR reference varieties appearing in the Slovenian production area, was 0.692. The genetic diversity *B. napus* SKS calculated value of selected polymorphic microsatellite markers was 0.664. The results are informative and could be especially useful for the seed purity analysis of economically important Brassicaceae species. We have also found that the volunteer ($H_e = 0.72$, $I = 1.73$, $N_p = 3.07$) and feral ($H_e = 0.69$, $I = 1.71$, $N_p = 4.60$) populations are genetically more diverse than reference *B. napus* varieties ($H_e = 0.66$, $I = 1.51$, $N_p = 3.76$). Based on calculations we could conclude that, when the spontaneous pollination occurs in nature, resulting in volunteer plants in the following year, which we have sampled, all the genetic diversity found in the current year (hence the value of H_e and I volunteers within the highest populations), has not yet been incorporated in the genomes of volunteer plants. With temporal self-recruited seeds of

these plants outside the production fields and the appearance of these plants in the wild, some of the gene flow has accumulated in the genomes of feral populations in the Slovenian production area. Temporal monitoring of gene flow using sequential increase of private alleles numbers, F_{st} values and molecular variance from 2007 to 2010, of volunteer and feral forms of *B. napus* and its SKR (*B. rapa* and *S. arvensis*) in the Slovenian production area shows, that the incorporation and conservation of transferred genes of self-recruited plant genomes, via spontaneous intra-and inter-specific pollination in nature, is possible. The spatial and genetic relationship between the *B. rapa* and *S. arvensis*, collected in the field during a 4-year period, was higher between the *B. rapa* and *S. arvensis* ($r_{xy} = 0.331$, $p = 0.01$) than within *B. napus* forms. The calculated value of r_{xy} shows, that within a specific area there are more genetically similar genotypes, self-recruited from generation to generation. Thus, the distribution on the basis of PCoA on 15 loci, all populations of *S. arvensis* from the field survey were in the same group, which is genetically the most distant from the genotypes of *B. napus* and from all its SKR, while the populations of the *B. rapa* from the field survey are included in the group of SKR genotypes. According to the low coefficient of genetic and geographical matrix uniformity, for all *B. napus* forms within the Slovenian production area ($r_{xy} = -0.027$, $p = 0.01$), we can assume that in general, genotypes within different regions are temporally and genetically very similar (6 and 10% of the variability and low F_{st} and R_{st} values within each region) and that these are equally represented in all regions and during all years. It is therefore not expected to get a high genetic and spatial relationship between all forms of *B. napus* in natural habitats. The calculated higher uniformity of geographic and genetic matrix for *B. napus* feral genotypes in Slovenia ($r_{xy} = 0.044$, $p = 0.01$), shows that feral plants that were grown close to each other pollinated each other, and were self-recruited from generation to generation, becoming genetically similar. Out-crossing rate was 8.8 %, which reflects the potential for gene flow via spontaneous inter-and intra-specific pollination of *B. napus* and its SKR within Brassicaceae family in the Slovenian production area based on the four year period.

We have also found that either the origin of microsatellites (from which species is isolated) or its structure, could not affect its informational content. We can conclude that genotyping of *B. napus* and its SKR within the Brassicaceae family, based on the results and the determined allele lengths at the same locus on 2n level, is appropriate. This represents the optimal compromise in terms of the genetic origin of genotypes analysed and the efficiency of computer programs for statistical analysis of results and parameters of population genetics, which enable estimates of gene flow and conservation via spontaneous crosses in the nature. Comparatively, more genetic information is captured on the basis of the determined allele lengths at the same locus on 4n level.

The results of the analysis of the GMO adventitious presence in *B. napus* populations sampled in Slovenia using the qualitative PCR analysis and Q-PCR analysis method with four screening genetic elements (*bar*, EPSPS, P35S and tNOS) was negative, as expected. From this we can conclude that during this period there was no adventitious presence of GMO's in the Slovenian production area.

Analysis of genetic diversity of *B. napus* and its SKS and assessment of gene flow via spontaneous pollination in Slovenia has been evaluated on the basis of spatial and temporal

level. Results reflect the actual pollinating potential of *B. napus* within the Brassicaceae family in the Slovenian production area.

7 VIRI

- A recommended procedure for real-time PCR quantitative TaqMan PCR for Roundup Ready Canola RT73. 2004. Missouri, Monsanto Biotechnology Regulatory Sciences: 7 str.
- Alamerew S., Chebotar S., Huang X., Röder M., Börner A. 2004. Genetic diversity in Ethiopian hexaploid and tetraploid wheat germplasm assessed by microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 51: 559–567
- Anderson J. A., Churchill G. A., Antrique J. E., Tanksley S. D., Sorrels M. E. 1993. Optimising parental selection for genetic linkage maps. *Genome*, 36: 181–188
- Angevin F., Klein E. K., Choimet C., Gauffreteau A., Lavigne C., Messéan A., Meynard J. M. 2008. *European Journal of Agronomy*, 28: 471–484
- Bagger Jørgensen R., Andersen B., Thure P. 1998. Introgression of crop genes from oilseed rape (*Brassica napus*) to related wild species - an avenue for the escape of engineered genes. *Acta Horticulture*, 459: 211–217
- Baptiste E. 2005. Do orthologous gene phylogenies really support tree-thinking? *BMC Evolutionary Biology*, 5: 33–55
- Barton N. H., Slatkin M. 1986. A quasi-equilibrium theory of the distribution of rare alleles in a subdivided population. *Heredity*, 56: 409–416
- Baskin C. C., Baskin J. M. 1998. Seeds, ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. San Diego, Academic Press: 395 str.
- Baskin J. M., Baskin C. C. 1985. The annual dormancy cycle in buried weed seeds: A continuum. *BioScience*, 35: 492–498
- Bateman A. J. 1955. Self-incompatibility in Angiosperms. III. Cruciferae. *Heredity*, 6: 53–68
- Batley J., Edwards D. 2007. SNP applications in plants. V: Association Mapping in Plants. Oraguzie N. C., Rikkerink E. H. A., Gardiner S. E., de Silva H. N. (eds.). New York, Springer: 95–102
- Beckie H. J., Warwick S. I., Nair H., Seguin-Swartz G. 2003. Gene flow in commercial fields of herbicide-resistant canola (*Brassica napus*). *Ecological Applications*, 13: 1276–1294
- Begg G. S., Elliott M. J., Copeland J., Squire G. R. 2007. Sources of uncertainty in the quantification of genetically modified oilseed rape contamination in seed lots. *Transgenic Research*, 16: 51–63
- Begg G. S., Hockaday S., McNicol J. W., Askew M., Squire G. R. 2006. Modelling the persistence of volunteer oilseed rape (*Brassica napus*). *Ecological Modelling*, 198: 195–207

- Belkhir K., Borsa P., Goudet J., Bonhomme F. 1999. Genetix: logiciel sous Windows pour la génétique des populations, Version 4.02. Université de Montpellier II, Laboratoire Genome, Populations, Interactions: 1 str.
<http://kimura.univ-montp2.fr/genetix/> (januar 2012)
- Bennetzen J. L. 1996. The contributions of retroelements to plant genome organization, function in evolution. *Trends in Microbiology*, 4: 347–353
- Berg E. S., Olaisen B. 1994. Hybrid PCR sequencing-sequencing of PCR products using a universal primer. *Biotechniques*, 17: 896–901
- Bing D. J., Downey R. K., Rakow F. W. 1996. Hybridizations among *B. napus*, *B. rapa* and *B. juncea* and their weedy relatives *B. nigra* and *S. arvensis* under open pollination conditions in the field. *Plant Breeding*, 115: 470–473
- Black M., Bewley J. D., Halmer P. 2006. The Encyclopedia of Seeds: Science, Technology and Uses. Wallingford, CAB International: 828 str.
- Blanchard J. L., Lynch M. 2000. Organellar genes: why do they end up in the nucleus? *Trends in Genetics*, 16: 315–320
- Bock A. K., Lheureux K., Libeau-Dulos M., Nilsagard H., Rodriguez-Cerezo E. 2002. Scenarios for co-existence of genetically modified, conventional and organic crops in European agriculture. Seville, Joint Research Centre: 133 str.
- Bohanec B., Javornik B., Strel B. 2004. Gensko spremenjena hrana. Ljubljana, Ministrstvo za okolje, prostor in energijo, Združenje živilske industrije pri Gospodarski zbornici Slovenije in Biotehniška fakulteta: 167 str.
- Bond J. M., Mogg R. J., Squire G. R., Johnstone C. 2004. Microsatellite amplification in *Brassica napus* cultivars: Cultivar Variability and relationship to a long-term feral population. *Euphytica*, 139: 173–178
- Boyes D. C., Nasrallah J. B. 1993. Physical linkage of the SLG and SRK genes at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Molecular and General Genetics*, 236: 369–373
- Brookfield J. F. Y. 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology* 5, 453–455
- Brown J., Brown A. P. 1996. Gene transfer between canola (*Brassica napus* L. and *B. campestris* L.) and related weed species. *Annals of Applied Biology*, 129: 513–522
- Butruille D. V., Guries R. P., Osborn T. C. 1999. Linkage analysis of molecular markers and quantitative trait loci in populations of inbred backcross lines of *Brassica napus* L. *Genetics*, 153: 949–964
- Cabrillac D., Delorme V., Garin J., Ruffio-Chable V., Giranton J. L., Dumas C., Gaudé T., Cock J. M. 1999. The S15 self-incompatibility haplotype in *Brassica oleracea* includes three S gene family members expressed in stigmas. *Plant Cell*, 11: 971–986
- Callan D. F., Thompson A. D., Shen Y., Philips H. A., Richards R. I., Mulley J. C., Sutherland G. R. 1993. Canola line 45h25 patent info: Johnston, Pioneer Hi-bred International: 2 str.

<http://www.freshpatents.com/Canola-line-45h25-dt20070419ptan20070089181.php>
(marec 2012)

- Chadoeuf R., Darmency H., Maillet J., Renard M. 1998. Survival of buried seeds of interspecific hybrids between oilseed rape, hoary mustard and wild radish. *Field Crops Research*, 58: 197–204
- Chakraborty R., Jin L. 1993. Estimation of genetic distance and coefficient of gene diversity from single-probe multilocus DNA fingerprinting data. *Molecular Biology and Evolution*, 11, 1: 120–127
- Chaouachi M., Fortbat M. N., Geldreich A., Yot P., Kerlan C., Kebdani N., Audeon C., Romaniuk M., Bertheau Y. 2007. An accurate real-time PCR test for the detection and quantification of cauliflower mosaic virus (CaMV): applicable in GMO screening. *European Food Research*, 227: 789–798
- Charters Y. M., Robertson A., Squire G. R. 1999. Investigation of Feral Oilseed Rape Populations. Aberdeen, The James Hutton Institute: 93 str.
- Chookajron T., Kachroo A., Ripoll D. R., Clark A. G., Nasrallah J. B. 2003. Specificity determinants and diversification of the *Brassica* self incompatibility pollen ligand. *Plant Biology*, 101: 911–917
- Chou I. T., Gasser C. S. 1997. Characterization of the cyclophilin gene family of *Arabidopsis thaliana* and phylogenetic analysis of known cyclophilin proteins. *Plant Molecular Biology*, 35: 873–892
- Colbach N., Clermont-Dauphin C., Meynard J. M. 2001a. GeneSys: a model of the influence of cropping system on gene escape from herbicide tolerant rapeseed crops to rape volunteers. II. Genetic exchanges among volunteer and cropped populations in a small region. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 83: 255–270
- Colbach N., Clermont-Dauphin C., Meynard J. M. 2001b. GeneSys: a model of the influence of cropping system on gene escape from herbicide tolerant rapeseed crops to rape volunteers. I. Temporal evolution of a population of rapeseed volunteers in a field. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 83: 235–253
- Colton B., Potter T. 1999. History. V: Canola in Australia: The first thirty years. Salisbury P., Potter T., McDonald G., Green A. G. (eds.). Canberra, The Regional institute Ltd.: 1–4
- Crabtree G. R., Clipstone N. A. 1994. Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annual Review of Biochemistry*, 63: 1045–1083
- Crawley M. J., Brown S. L. 1995. Seed limitation and the dynamics of feral oilseed rape on the M25 motorway. *Proceedings of Royal Society of London*, 259: 49–54
- Crawley M. J., Brown S. L. 2004. Spatially structured population dynamics in feral oilseed rape. *International Journal of Biological Sciences*, 271: 1909–1916
- Crawley M. J., Brown S. L., Hails R. S., Kohn D. D., Rees M. 2001. Transgenic crops in natural habitats. *Nature*, 409: 682–683

- Csontos P. 2007. Seed banks: ecological definitions and sampling considerations. *Community Ecology*, 8, 1: 75–85
- Cui Y., Brugiere N., Jackman L., Bi Y. M., Rothstein S. J. 1999. Structural and transcriptional comparative analysis of the S locus regions in two self-incompatible *Brassica napus* lines. *Plant Cell*, 11: 2217–2231
- Čergan Z., Dolničar P., Janhar B., Meglič V., Rostohar K., Šuštar - Vozlič J., Verbič J. 2006. Izdelava ocene tveganja za nenamerno sproščanje gensko spremenjene oljne ogrščice, koruze in krompirja v Sloveniji in izdelava predloga okoljskega monitoringa. Ljubljana, Ministrstvo za okolje in prostor: 64 str.
- Čergan Z., Dolničar P., Kozjak P., Meglič V., Šuštar - Vozlič J., Ugrinović K., Verbič J., Vrščaj B., Zemljič A. 2005. Soobstoj in ohranjanje biotske raznovrstnosti v kmetijstvu (agrobiodiverzitete): Specifične tehnologije pridelovanja in ohranjanje genskih virov kmetijskih rastlin. Ljubljana, Ministrstvo za okolje in prostor: 48 str.
- Čergan Z., Dolničar P., Meglič V., Pintar M., Pipan B., Rutar R., Šuštar - Vozlič J., Verbič J. 2007. Izdelava predloga za določanje pragov za označevanje prisotnosti gensko spremenjenega semena v drugem semenu. Ljubljana, Ministrstvo za okolje in prostor: 47 str.
- Darmency H., Fleury A. 2000. Mating system in *Hirshfeldia incana* and hybridization to oilseed rape. *Weed Research*, 40: 231–238
- Davis C. C., Wurdack K. J. 2004. Host-to-Parasite Gene Transfer in Flowering Plants: Phylogenetic Evidence from Malpighiales. *Science*, 305: 676–678
- Debeljak M., Squire G., Demšar D., Young M. W., Džeroski S. 2008. Relations between the oilseed rape volunteer seedbank, and soil factors, weed functional groups and geographical location in the UK. *Ecological Modelling*, 212: 138–146
- Debeljak M., Squire G., Kocev D., Hawes C., Young M. W., Džeroski S. 2011. Analysis of time series data on agroecosystem vegetation using predictive clustering trees. *Ecological Modelling*, 222, 14: 2524–2529
- Devos Y., Reheul D., De Schrijver A. 2005. The co-existence between transgenic and non-transgenic maize in the European Union: a focus on pollen flow and cross-fertilization. *Environmental Biosafety Research*, 4, 2: 71–87
- Diao X. M., Freeling M., Lisch D. 2006. Horizontal transfer of a plant transposon. *Plos Biology*, 4: 119–128
- Eastham K., Sweet J. 2002. Genetically modified organisms (GMOs): of gene flow through pollen transfer. *Environmental Issue Report*, 28: 15–26
- Edh K., Widéen B., Ceplitis A. 2009. The evolution and diversification of S-locus haplotypes in the Brassicaceae family. *Genetics*, 181: 977–984
- Elleman C. J., Dickinson H. G. 1994. Pollen-stigma interaction during sporophytic self-incompatibility in *Brassica oleracea*. V: Genetic control of self-Incompatibility and reproductive development in flowering plants. Williams E. G., Knox R. B. (eds.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 67–87

- Ellig B., Neuffer B., Bleeker W. 2009. Sources of genetic diversity in feral oilseed rape (*Brassica napus*) populations. *Basic and Applied Ecology*, 10: 544–553
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611–2620
- Excoffier L., Lischer H. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10: 564–567
- Fehr W. R. 1987. *Principles of Cultivar Development: Theory and Technique*. New York, Macmillan Publishing Company: 536 str.
- Ferris P. J., Armbrust E. V., Goodenough U. W. 2002. Genetic structure of the mating-type locus of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics*, 160: 181–200
- Fischer G., Bang H., Mech C. 1984. Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans isomerization of peptide binding in prolinecontaining peptides. *Biomedica Biochimica Acta*, 43: 1101–1111
- Fischer G., Wittmann-Liebold B., Lang K., Kiefhaber T., Schmid F. X. 1989. Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature*, 337: 476–478
- Flannery M. L., Mitchell F. J. G., Hodkinson T. R., Kavanagh T., Dowding P., Coyne S., Burke J. I. 2004. Environmental risk assessment of genetically modified crops: The use of molecular markers to trace insect and wind dispersal of *Brassica napus* pollen. Dublin, Teagasc: 19 str.
<http://www.teagasc.ie/research/reports/environment/4801/eopr4801.pdf> (avgust 2012)
- Fobis-Loisy I., Miede C., Gaude T. 2004. Molecular evolution of the S-locus controlling mating in the Brassicaceae. *Plant Biology*, 6: 109–118
- Foor F., Parent S. A., Morin N., Dahl A. M., Ramadan N., Chrebet G., Bostian K. A., Nielsen J. B. 1992. Calcineurin mediates inhibition by FK506 and cyclosporin of recovery from a-factor arrest in yeast. *Nature*, 360: 682–684
- Friedt W., Snowdon R. 2009. Oil crops, *Handbook of Plant Breeding* 4. V: Oilseed rape. Vollman J., Rajcan I. (eds.). Giessen, Springer Science+Business Media: 91–126
- Garnier A., Lecomte J. 2006. Using a spatial and stage-structured invasion model to assess the spread of feral populations of transgenic oilseed rape. *Ecological Modelling*, 194: 141–149
- Ghatnekar L., Jaarola M., Bengtsson B. O. 2006. The introgression of a functional nuclear gene from *Poa* to *Festuca ovina*. *Biological Sciences*, 273: 395–399
- Glenn T. C. 2006. Directly tagging PCR primers with fluorescent dyes. South Carolina, Drawer University, Department of Biological Sciences: 4 str.
- Gómez-Campo C. 1999. *Taxonomy. V: Biology of Brassica coenospecies*. Gómez-Campo C (ed.). Amsterdam, Elsevier Science: 3–32

- Gororo N. 2007. Speciality Canola: high stability canola varieties. Amjad M., Cowling W.A. (eds.). Australian Government, Department of Sgriculture and Food Western Australia: 63 str.
- Gothel S. F., Marahiel M. A. 1999. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55: 423–436
- Goudet J. 2002. FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Version 2.9.3.2. Lausanne, Institute of Ecology and Evolution: 2 str.
<http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html> (februar 2012)
- Grappin P., Bouinot D., Sotta B., Miginiac E., Jullien M. 2000. Control of seed dormancy in *Nicotiana plumbaginifolia*: Post-imbibition abscisic acid synthesis imposes dormancy maintenance. *Planta*, 210: 279–285
- Gruber S., Bühler A., Möhring J., Claupein W. 2010. Sleepers in the soil-Vertical distribution by tillage and long-term survival of oilseed rape seeds compared with plastic pellets. *European Journal of Agronomy*, 33: 81–88
- Guo J., Liu Y., Wang Y., Chen J., Li Y., Huang H., Qui L., Wang Y. 2012. Population structure of the wild soybean (*Glycine soja*) in China: implications from microsatellite analysis. *Annals of Botany*, 110: 777–785
- Hails R. S., Rees M., Kohn D. D. and Crawley M. J. 1997. Burial and seed survival in *Brassica napus* subsp. *oleifera* and *Sinapis arvensis* including a comparison of transgenic and non-transgenic lines of the crop. *Proceedings of the Royal Society London B*, 264: 1–7
- Halfhill M. D., Sutherland J. P., Moon H. S., Poppy G. M., Warwick S. I., Weissinger A. K., Rufty T. W., Raymer P. L., Stewart C. N. 2005. Growth, productivity and competitiveness of introgressed weedy *Brassica rapa* hybrids selected for the presence of Bt cry1Ac and gfp transgenes. *Molecular Ecology*, 14: 3177–3189
- Halfhill M. D., Zhu B., Warwick S. I., Raymer P. L., Millwood R. J., Weissinger A. K., Stewart C. N. Jr. 2004. Hybridization and backcrossing between transgenic oilseed rape and two related weed species under field conditions. *Environmental Biosafety Research*, 3: 73–81
- Hall C., Brachat S., Dietrich F. S. 2005 Contribution of Horizontal Gene Transfer to the Evolution of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 4: 1102–1115
- Handschumacher R. E., Harding M. W., Rice J., Drugge R. J., Speicher D. W. 1984. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science*, 226: 544–547
- Hanna G. 2007. Contribution a la recherche et la detection des orhanismes genetiquement modifies de colza en region Wallone. Memoire presente en vue de l'obtention du Diplome du Master en Biodiversite et Biotechnologie vegetale. Gemploux, Faculte des Sciences Agronomiques: 82 str.
- Hardy O. J., Charbonnel N., Fréville H., Heuertz M. 2003. Microsatellite allele sizes: A simple test to assess their significance on genetic differentiation. *Genetics*, 163: 1467–1482

- Hasan M., Friedt W., Pons-Kühnemann, Freitag N. M., Link K., Snowdon R. J. 2008. Association of gene-linked SSR markers to seed glucosinolate content in oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *napus*). Theoretical Applied Genetics, 116: 1035–1049
- Hasan M., Seyis F., Badani A. G., Pons-Kühnemann J., Friedt W., Lühs W., Snowdon R. J. 2006. Analysis of genetic diversity in the *Brassica napus* L. gene pool using SSR markers. Genetic Resources and Crop Evolution, 53: 793–802
- Hatakeyama K., Takasaki T., Watanabe M., Hinata K. 1998. Molecular characterization of S locus genes, SLG and SRK, in a pollen-recessive self-incompatibility haplotype of *Brassica rapa* L. Genetics, 149: 1587–1597
- Hauser T. P., Jørgensen R. B., Østergard H. 1998. Fitness of backcross and F2 hybrids between weedy *Brassica rapa* and oilseed rape (*B. napus*). Heredity, 81: 436–443
- He S., Wang Y., Volis S., Li D., Yi T. 2012. Genetic diversity and population structure: Implications for conservation of wild soybean (*Glycine soja* Sieb. Et Zucc) based on nuclear and chloroplast microsatellite variation. International Journal of Molecular Sciences, 13: 12628–12628
- Huff D. R., Peakall R., Smouse P. E. 1993. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss *Buchloe dactyloides* (Nutt) Engelm. Theoretical Applied Genetics, 86: 927–934
- Huremagič Z. 2005. Pregled domačih in udomačenih slovenskih sort kmetijskih rastlin ter žlahtnjenja v Sloveniji. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 54 str.
- Husken A., Dietz-Pfeilstetter A. 2007. Pollen-mediated intra-specific gene flow from herbicide resistant oilseed rape (*Brassica napus* L.). Transgenic Research, 16, 5: 557–569
- Inaba R., Nishio T. 2002. Phylogenetic analysis of Brassicaceae based on the nucleotide sequences of the S locus related gene SLR1. Theoretical Applied Genetics, 104: 1159–1165
- James D., Schmidt A. M., Wall E., Green M., Masri S. 2003. Reliable detection and identification of genetically modified maize, soybean and, canola by multiplex PCR. Journal of Agricultural Food Chemistry, 51: 5829–5834
- Jogan N., Bačič T., Frajman B., Leskovar - Štamcar I., Naglič D., Podobnik A., Rozman B., Strgulc - Krajšek S., Trčak B. 2001. Gradivo za Atlas flore Slovenije. Miklavž na Dravskem polju, Center za kartografijo favne in flore: 443 str.
- Jørgensen R. B., Andersen B., Landbo L., Mikkelsen T. R. 1996. Spontaneous hybridization between oilseed rape (*Brassica napus*) and weedy relatives. Acta Horticulturae, 407: 193–200
- Jørgensen R. B., Hauser T., Landbo L., Mikkelsen T. R., Østergard H. 1999. *Brassica napus* and *Brassica campestris*: spontaneous hybridization, back-crossing and fitness components of offspring plants. V: Environmental Impact of Genetically Modified Crops. London, Department of the Environment, Transport and the Regions: 20–27

- Juricic S., Orlando S., Lepage-Degivry M. T. 1995. Genetic and ontogenic changes in sensitivity to abscisic acid in *Brassica napus* seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 33: 593–598
- 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: 227–238
- Kimura R., Sato K., Fujimoto R., Nishio T. 2002. Recognition specificity of self-incompatibility maintained after the divergence of *Brassica oleracea* and *Brassica rapa*. *The Plant Journal*, 29: 215–223
- Kjaer A. 1940. Germination of buried and dry stored seeds. I. 1934–1939, *Proceedings International Seed Testing Association*, 12: 167–190
- Kjaer A. 1948. Germination of buried and dry stored seeds. II. 1934–1944, *Proceedings International Seed Testing Association*, 14: 19–26
- Kocjan Ačko D. 1999. Pozabljene poljščine. Ljubljana, Založba Kmečki glas: 187 str.
- Kresovich S., Szewc-McFadden A. K., Blik S. M., McFerson J. R. 1995. Abundance and characterization of simple sequence repeats (SSRs) isolated from a size-fractionated genomic library of *Brassica napus* L. (rapeseed). *Theoretical Applied Genetics*, 91: 206–211
- Kump B., Svetek S., Javornik B. 1992. Izolacija visokomolekularne DNK iz rastlinskih tkiv. *Zbornik Biotehniške fakultete*, 59: 63–66
- Kuribara H., Shindo Y., Matsuoka T., Takubo K., Futo S., Aoki N., Hirao T., Akiyama H., Goda Y., Toyoda M., Hino A. 2002. Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and soybean. *Journal AOAC International*, 85, 5: 1077–1089
- Kusaba M., Dwyer K., Hendershot J., Vrebalov J., Nasrallah J. B., Nasrallah M. E. 2001. Self-incompatibility in the genus *Arabidopsis*: characterization of the S locus in the outcrossing *A. lyrata* and its autogamous relative *A. thaliana*. *Plant Cell*, 13: 627–643
- Kusaba M., Tung C. W., Nasrallah M. E., Nasrallah J. B. 2002. Monoallelic expression and dominance interactions in anthers of self-incompatible *Arabidopsis lyrata*. *Plant Physiology*, 128: 17–20
- Lake J. A., Rival M. C. 2004. The Ring of Life Provides Evidence for a Genome Fusion Origin of Eukaryotes. *Nature*, 431: 152–155
- Langella O. 2002. Population 1.2.28. Logiciel de génétique des populations. Boston, Laboratoire Populations: 6 str.
<http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/> (januar 2012)
- Larsen S. U., Povlsen F. V., Eriksen E. N., Pedersen H. C. 1998. The influence of seed vigour on field performance and the evaluation of the applicability of the controlled deterioration vigour test in oilseed rape (*Brassica napus*) and pea (*Pisum sativum*). *Seed Science Technology*, 26: 627–641

- Lavigne C., Godelle B., Reboud X., Gouyon P. H. 1996. A method to determine the mean pollen dispersal of individual plants growing within a large pollen source. *Theoretical Applied Genetics*, 93: 1319–1326
- Lefol E., Danielou V., Darmency H. 1996. Predicting hybridization between transgenic oilseed rape and wild mustard. *Field Crops Research*, 45: 153–161
- Lheureux K., Libeau-Dulos M., Nilsagard H., Rodriguez Cerezo E., Menrad K., Menrad M., Vorgrimler D. 2003. Review of GMOs under research and development and in the pipeline in Europe. Seville, Joint Research Centre, Institute for Prospective and Technological Studies: 122 str.
- Li G., Quiros C. F. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theoretical Applied Genetics*, 103: 455–461
- Linder C. R., Schmitt J. 1994. Assessing the risks of transgene escape through time and cropwild hybrid persistence. *Molecular Ecology*, 3: 23–30
- Linder C. R., Schmitt J. 1995. Potential persistence of escaped transgenes: performance of transgenic oil-modified *Brassica* seeds and seedlings. *Ecological Applications*, 5: 1056–1068
- Lipp M., Bluth A., Eyquem F., Kruse L., Schimmel H., Van den Eede G., Anklam E. 2001. Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. *European Food Research Technology*, 212: 497–504
- Liste des variétés admises à la certification des semences 2005–2006. 2006. Paris, OECD: 374 str.
- Liste des variétés admises à la certification des semences 2012. 20012. Paris, OECD: 370 str.
- Liu J., Liu L., Hou N., Zhang A., Liu C. 2007. Genetic diversity of wheat gene pool of recurrent selection assessed by microsatellite markers and morphological traits. *International Journal of Plant Breeding*, 155, 1-2: 249–258
- López-Granados F., Lutman P. J. W. 1998 Effect of environmental conditions on the dormancy and germination of volunteer oilseed rape seed (*Brassica napus*). *Weed Science*, 46: 419–423
- Lowe A. J., Moule C., Trick M., Edwards K. J. 2004. Efficient large-scale development of microsatellites for marker and mapping applications in *Brassica* crop species. *Theoretical Applied Genetics*, 108: 1103–1112
- Luan S., Lane W. S., Schreiber S. L. 1994. pCyPB: a chloroplasticlocalized, heat shock-responsive cyclophilin from fava bean. *Plant Cell*, 6: 885–892
- Luan S., Li W., Rusnak F., Assmann S. M., Schreiber S. L. 1993. Immunosuppressants implicate protein phosphatase regulation of K⁺ channels in guard cells. *Proceedings of the National Academy of Science*, 90: 2202–2206

- Lühs W., Friedt W. 1994. Non-food uses of vegetable oils and fatty acids. V: Designer Oil Crops. Murphy D. J. (ed). New York, VCH: 73–130
- Lutman P. J. W. 2003. Co-existence of conventional, organic and GM crops – role of temporal and spatial behaviour of seeds. V: Proceedings of the First European conference on the co-existence of genetically modified crops with conventional and organic crops. Boelt B. (ed.). Slagelse, Danish Institute of Agricultural Sciences, Research Centre Flakkebjerg: 33–42
- Lynch M., Ritland K. 1999. Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. Genetics, 152: 1753–1766
- Madsen S. B. 1962. Germination of buried and dry stored seeds. III. 1934–1960. Proceedings International Seed Testing Association, 27, 4: 920–928
- Mantel N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Research, 27: 209–220
- Marshall B., Dunlop G., Ramsay G., Squire G. R. 2000. Temperature-dependent germination traits in oilseed rape associated with 5.-anchored simple sequence repeat PCR polymorphisms. Journal of Experimental Botany, 51, 353: 2075–2084
- Martinčič A., Wraber T., Jogan N., Podobnik A., Turk B., Vreš B. 2007. Mala flora Slovenije. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 967 str.
- Maruyama T., Furutani M. 2000. Archeal peptidyl prolyl cis-trans isomerases (PPIases). Frontiers in Bioscience, 5: 821–836
- 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
- McLaughlin M. M, Bossard M. J, Koser P. L, Cafferkey R., Morris R. A, Miles L. M, Strickler J., Bergsma D. J., Levy M. A., Livi G. P. 1992. The yeast cyclophilin multigene family: purification, cloning and characterization of a new isoform. Gene, 111: 85–92
- McNaughton I. H. 1995. Swede and rapes – *Brassica napus* (Cruciferaeae). V: Evolution of crop plants. Smartt J., Simmonds N.W. (eds.). London, Longman Scientific & Technical: 68–75
- Meglič V., Dovč P., Kraigher H. 2003. Ocena pogojev in mehanizmov za ex situ varstvo genskih virov kmetijskih rastlin, genskih bank v gozdarstvu in živinoreji. Ljubljana, Ministrstvo za okolje in prostor: 39 str.
http://www.arhiv.mop.gov.si/fileadmin/mop.gov.si/pageuploads/podrocja/okolje/pdf/ocena_genski_viri_kmet_rast.pdf (september 2012)
- Meglič V., Šuštar - Vozlič J., Čergan Z., Zagorc B. 2005. Sobivanje ali koeksistenca gensko spremenjenih rastlin s konvencionalno in biološko pridelavo. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 63 str.
- Metz P. L. J., Jacobson E., Nap J. P., Pereira A., Stiekema W. J. 1997. The impact on biosafety of the phosphinotricin-tolerance transgene in inter-specific *B. rapa* x *B. napus* hybrids and their successive backcrosses. Theoretical Applied Genetics, 95: 442–450

- Miege C., Ruffio-Chable V., Schierup M. H., Cabrillac D., Dumas C., Gaudé T., Cock J. M. 2001. Intrahaplotype polymorphism at the *Brassica* S locus. *Genetics*, 159: 811–822
- Molla M. R., Islam M. N., Rohman M. M., Choudhury R. U., Rahman L. 2010. The use of SSR DNA markers to reveal the polymorphism at ploidy level in cultivated rapeseed varieties in Bangladesh. *Global Journal of Biotechnology&Biochemistry*, 5, 2: 141–144
- Momoh E. J. J., Zhou W. J., Kristiansson B. 2002. Variation in the development of secondary seed dormancy in oilseed rape genotypes under conditions of stress. *Weed Research*, 42: 446–455
- Nagaharu U. 1935. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Japan Journal of Botany*, 7: 389–452
- Nasrallah J. B., Nasrallah M. E. 1993. Pollen-stigma signaling in the sporophytic self-incompatibility response. *The Plant Cell*, 5: 1325–1335
- Neeser C. 1999. Report of the *Brassica* Crops Working Group. Rome, FAO-IPGRI: 5 str.
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106: 283–392
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583–590
- Nei M. 1973: Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70: 3321–3323
- Nei M., Li W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76: 5269–5273
- Nemri A., Barrett L. G., Laine A. L., Burdon J. J., Thrall P. H. 2012. Population Processes at Multiple Spatial Scales Maintain Diversity and Adaptation in the *Linum marginale* - *Melampsora lini* Association. *PLoS ONE* 7, 7: 22 str.
e41366. doi:10.1371/journal.pone.0041366
- Nettancourt D. 1977. Incompatibility in Angiosperms. Berlin, Springer-Verlag: 230 str.
- Neubert M. G., Caswell H. 2000. Demography and dispersal: calculation and sensitivity analysis of invasion speed for structured populations. *Ecology*, 81: 1613–1628
- Newbigin E., Anderson M. A., Clarke A. C. 1994. Gametophytic self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. V: Genetic control of Self- Incompatibility and Reproductive Development in Flowering Plants. Williams E. G., Elizabeth G., Clarke A. E., Knox R. B. (eds.): Dordrecht, Kluwer Academic Publishing: 540 str.
- Nickrent D. L., Blarer A., Qiu Y. L., Vidal-Russell R., Anderson F. E. 2004. Phylogenetic inference in Rafflesiales: the influence of rate heterogeneity and horizontal gene transfer. *BMC Evolutionary Biology*, 4: 40–55
- Nolte M., Kotzé A., von der Bank F. H., Grobler J. P. 2005. Microsatellite markers reveal low genetic differentiation among southern African *Camelus dromedarius* populations. *South African Journal of Animal Science*, 35, 3: 152–161

- Osborne J. L., Martin A. P., Carreck N. L., Swain J. L., Knight M. E. *Journal of Animal Ecology*, 77: 406–415
- Østergard H., Colbach N. 2006. Simulation of gene flow using GeneSys under Danish conditions for oilseed rape co-existence. Montpellier, Agropolis Productions: 2 str.
- Paetkau D., Calvert W., Stirling I., Strobeck C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology*, 4: 347–354
- Page R. D. M. 1996. TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12: 357–358
- Park S. 2001. Microsatellite Toolkit. Ireland, Genetics Department TCD: 1 str.
<http://oscar.gen.tcd.ie/sdepark/ms-toolkit> (januar 2012)
- Parkin I. A. P., Sharpe A. G., Keith D. J., Lydiate D. J. 1995. Identification of the A and C genomes of amphidiploid *Brassica napus* (oilseed rape). *Genome*, 38: 1122–1131
- Pascher K., Narendja F., Rau D. 2006. Feral Oilseed Rape-Investigations on its Potential Hybridisation. Viena, Federal Ministry of Health and Women: 56 str.
- Pascher K., Macalka S., Rau D., Gollman G., Reiner H., Glössl J., Grabherr G. 2010. Molecular differentiation of commercial varieties and feral populations of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *BMC Evolutionary Biology*, 10, 63: 6 str.
doi: 10.1186/1471-2148-10-63 (september 2012)
- Pavlicek A., Hrda S., Flegr J. 1999. FreeTree - Freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of the genus *Frenkelia*. *Folia Biologica (Praha)* 45, 97–99
- Peakall R., Smouse P. 2010. GenAlEx 6.4, Appendix 1: Methods and Statistics. Australia, The Australian National University: 30 str.
- Peakall R., Smouse P. E. 2006. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288–295
- Pearse D. E., Crandall K. A. 2004. Beyond Fst: Analysis of population genetic data for conservation. *Conservation Genetics*, 5: 585–602
- Pekrun C., Hewitt J. D. J., Lutman P. J. W. 1998. Cultural control of volunteer oilseed rape (*Brassica napus*). *Journal of Agricultural Science*, 130: 155–163
- Pekrun C., Lutman P. J. W., Baeumer K. 1997. Induction of secondary dormancy in rape seeds by prolonged imbibition under conditions of water stress or oxygen deficiency in darkness. *European Journal of Agronomy*, 6: 245–255
- Pekrun C., Lane P. W., Lutman, P. J. W. 2005. Modelling seed bank dynamics of volunteer oilseed rape (*Brassica napus*). *Agricultural Systems*, 84: 1–20
- Perkun C., Lutman P. J. W. 1998. The influence of post-harvest cultivation on the persistence of volunteer oilseed rape. *Aspects of Applied Biology*, 51: 113–118

- Pessel F. D., Lecomte J., Emeriau V., Krouti M., Messean A., Gouyon P. H. 2001. Persistence of oilseed rape (*Brassica napus* L.) outside of cultivated fields. *Theoretical Applied Genetics*, 102: 841–846
- Petit R. J., El Mousadik A., Pons O. 1998. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology*, 12: 844–849
- Phipps R. H., Park J. R. 2002. Environmental benefits of genetically modified crops: Global and European perspectives on their ability to reduce pesticide use. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 11: 1–18
- Piazza G. J., Foglia T. A. 2001. Rapeseed oil for oleochemical usage. *European Journal of Lipid Science Technology*, 103:450-454
- Pipan B., Šuštar Vozlič J., Meglič V. 2008. Oilseed rape production at the Slovenian landscape level and survey of crop to wild gene flow. V: Implications of GM-crop cultivation at large spatial scales. Breckling B., Reuter H., Verhoeven R. (eds.). Bremen, Internationaler Verlag der Wissenschaften: 27–29
- Pipan B., Šuštar Vozlič J., Meglič V. 2011. Cultivation, varietal structure and possibilities for cross-pollination of *Brassica napus* L. in Slovenia. *Acta agriculturae Slovenica*, 97, 3: 247–258
- Piquemal J., Cinquin E., Couton F., Rondeau C., Signoret E., Doucet I., Perret D., Villeger M.-J., Vincourt P., Blanchart P. 2005. Construction of an oilseed rape (*Brassica napus* L.) genetic map with SSR markers. *Theoretical Applied Genetics*, 111: 1514–1523
- Plieske J., Struss D. 2001. Microsatellite markers for genome analysis in *Brassica*. I. development in *Brassica napus* and abundance in Brassicaceae species. *Theoretical Applied Genetics*, 102: 689–694
- Pravilnik o trženju semena oljnic in predivnic. Ur. l. RS, št. 8/05
- Pretvornik med koordinatnimi sistemi. 2012. Ljubljana, Zveza Radioamaterjev Slovenije: 1 str.
<http://www.mkx.si/geoconv> (junij 2012)
- Price J. S., Hobson R. N., Neale M. A., Bruce D. M. 1996. Seed losses in commercial harvesting of oilseed rape. *Journal of Agricultural Engineering Research*, 65: 183–191
- Pritchard J. K., Wen X., Falush D. 2009. STRUCTURE ver. 2.3 Chicago, University of Chicago: 38 str.
<http://pritch.bsd.uchicago.edu/> (januar 2012)
- Privard S., Adamczyk K., Lecomte J., Lavigne C., Bouvier A., Deville A., Gouyon P. H., Huet S. 2008. Where do the feral oilseed rape populations came from? A large-scale study of their possible origin in a farmland area. *Journal of Applied Ecology*, 45: 476–485
- Probert R. J. 2000. The role of temperature in the regulation of seed dormancy and germination. V: *Seeds: The ecology of regeneration in plant communities*, 2nd edition. Fenner M. (ed.). New York, CABI Publishers: 42 str.

- Quiros C. F., Grellet F., Sadowski J., Suzuki T., Li G., Wroblewski T. 2001. *Arabidopsis* and *Brassica* comparative genomics: sequence, structure and gene content in the ABI1-Rps2-Ck1 chromosomal segment and related regions. *Genetics*, 157: 1321–1330
- Rakow and Woods D. L. 1987: Outcrossing in rape and mustard under Saskatchewan prairie conditions. *Canadian Journal of Plant Science*, 67: 147–151
- Ramsay G., Thompson C., Squire G. 2003. Quantifying Landscape-Scale Gene Flow in Oilseed Rape. London, Department for Environment, Food and Rural Affairs: 50 str. http://www.scri.ac.uk/scri/file/EPI/Agroecology/Landscape_scale_gene_flow_in_oilseed_rape_rg0216.pdf (januar 2011)
- Rastlinska pridelava, podrobni podatki, Slovenija in kohezijski regiji: SI-STAT podatkovni portal. 2011. Ljubljana, Statistični urad RS: 1 str. http://pxweb.stat.si/pxweb/Dialog/varval.asp?ma=1502402S&ti=&path=../Database/Okolje/15_kmetijstvo_ribistvo/04_rastlinska_pridelava/01_15024_pridelki_povrsina/&lang=2 (september 2012)
- Richardson A. O., Palmer J. D. 2007. Horizontal gene transfer in plants. *Journal of Experimental Botany*, 58: 1–9
- Rong J., Janson S., Umehara M., Ono M., Vrieling K. Historical and contemporary gene dispersal in wild carrot (*Daucus carota* ssp. *carota*) populations. *Annals of Botany*, 106: 285–296
- Rousset F. 2008. Genepop 4.1.0: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8: 103–106
- Rusjan D., Pipan B., Pelengić R., Meglič V. 2012. Genotypic and phenotypic discrimination of grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties of the 'Vitovska' and 'Garganja' Denominations. *European Journal of Horticultural Science*, 77, 2: 84–94
- Sagers C. L., Schafer M. G., Jaquish B. 2010. Wild canola populations contain genes for herbicide tolerance. Arkansas, University of Arkansas Newswire: 2 str. <http://newswire.uark.edu/article.aspx?id=14453> (avgust 2010)
- Saitou N., Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406–425
- Sakamoto K., Kusaba M., Nishio T. 1998. Polymorphism of the S-locus glycoprotein gene (SLG) and the S-locus related gene (SLR1) in *Raphanus sativus* L. and self-incompatible ornamental plants in the Brassicaceae. *Molecular and General Genetics*, 258: 397–403
- Salisbury P. 2006. Biology of *Brassica juncea* and potential gene flow from *B. juncea* to *Brassicaceae* species in Australia. Melbourne, University of Melbourne: 15 str.
- Salisbury P. A. 2002. Gene flow between *Brassica napus* and other Brassicaceae species. Melbourne, Institute of Land and Food Resources, University of Melbourne: 54 str. <http://abe.dynamicweb.dk/images/files/Gene%20flow%20to%20other%20Brassicaceae%20species%20report%20-%20April%202002.pdf> (oktober 2012)

- Sato K., Nishio T., Kimura R., Kusaba M., Suzuki T., Hatakeyama K., Ockendon D. J., Satta Y. 2002. Coevolution of the S locus genes SRK, SLG and SP11/SCR in *Brassica oleracea* and *B. rapa*. *Genetics*, 162: 931–940
- Schafer M. G., Ross A. A., Londo J. P., Burdick C. A., Lee E. H., Travers S. E., Van de Water P. K., Sagers C. 2011. The establishment of genetically engineered Canola populations in the U.S. *PLoS ONE*, 6, 10: e25736
doi: 10.1371/journal.pone.0025736
- Scheffler J. A., Dalle P. J. 1994. Opportunities for gene transfer from transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) to related species. *Transgenic Research*, 3: 263–278
- Schiemann E. 1932. Entstehung der Kulturpflanzen. Berlin, Gebrüder Borntraeger: 377 str.
- Schierup M. H., Mable B. K., Awadalla P., Charlesworth D. 2001. Identification and characterization of a polymorphic receptor kinase gene linked to the self-incompatibility locus of *Arabidopsis lyrata*. *Genetics*, 158: 387–399
- Schlink S. 1994. Ökologie der Keimung und Dormanz von Körnerraps (*Brassica napus* L.) und ihre Bedeutung für eine Überdauerung der Samen im Boden. *Dissertationes Botanicae*, 222
- Schlink S. 1995. Überdauerungsvermögen und Dormanz von Rapsamen (*Brassica napus* L.) im Boden. V: Challenges for Weed Science in a Changing Europe. Budapest, European Weed Research Society: 65–72
- Schlötterer C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109: 365–371
- Schmidt R. 2002: Plant genome evolution: Lessons from comparative genomics at the DNA level. *Plant Molecular Biology*, 48: 21–37
- Schmidt R., Acarkan A., Boivin K. 2001. Comparative structural genomics in the Brassicaceae family. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39: 253–262
- 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
- Scott S. E., Wilkinson M. J. 1998. Transgene risk is low. *Nature*, 393: 320–326
- Shiba H., Iwano M., Entani T., Ishimoto K., Shimosato H., Che F. S., Satta Y., Ito A., Takada Y., Watanabe M., Isogai A., Takayama S. 2002. The dominance of alleles controlling self-incompatibility in *Brassica* pollen is regulated at the RNA level. *Plant Cell*, 14: 491–504
- Siemens J. 2002. Interspecific Hybridization between wild relatives and *Brassica napus* to introduce new resistance traits into the oilseed rape gene pool. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 38, 3-4: 155–157
- Silva N. F., Stone S. L., Christie L. N., Sulaman W., Nazarian K. A., Burnett L. A., Arnoldo M. A., Rothstein S. J., Goring D. R. 2001. Expression of the S receptor kinase in self-compatible *Brassica napus* cv. Westar leads to the allele-specific rejection of

- self-incompatible *Brassica napus* pollen. *Molecular Genetics and Genomics*, 265: 552–559
- Simard M. J., Légère A., Pageau D., Lajeunesse J., Warwick S. I. 2002. The frequency and persistence of volunteer canola (*Brassica napus*) in Québec cropping systems. *Weed Technology*, 16: 433–439
- Slatkin M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139: 1463–1466
- Slatkin M., Excoffier L. 1996 Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the EM algorithm. *Heredity*, 76: 377–383
- Smit E., Bakker P. A. H. M., Bergmans H., Bloem J., Griffiths B. S., Rutgers M., Sanvido O., Singh B. K., van Veen H., Wilhelm R., Glandorf D. C. M. 2012. *Ecological Indicators*, 14: 107–113
- Sneath P. H. A., Sokal R. R. 1973. *Numeric taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. San Francisco, Freeman: 573 str.
- Snowdon R. J., Friedt W. 2004. Review: Molecular markers in *Brassica* oilseed breeding: current status and future possibilities. *Plant Breeding*, 123: 1–8
- Snowdon R., Lühs W., Friedt W. 2007. *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants. V: Oilseeds, Volume 2*. Kole C. (ed.). Berlin, Springer-Verlag: 55–11
- Sobotka R., SÁKOVÁ L., CURN V. 2000. Molecular mechanisms of self-Incompatibility in *Brassica*. *Current Issues of Molecular Biology*, 2, 4: 103–112
- Song K., Osborn T. C. 1992. Polyphyletic origins of *Brassica napus*: new evidence based on organelle and nuclear RFLP analyses. *Genome*, 35: 992–1001
- Strokovni predlog za zavarovanje Krajinskega parka Dragonja. 2009. Piran, Zavod RS za varstvo narave: 60 str.
- Squire G. R. 1999. Temperature and heterogeneity of emergence time in oilseed rape. *Annals of Applied Biology*, 135: 439–447
- Squire G. R., Begg G. S., Askew M. 2003. The potential for oilseed rape feral (volunteer) weeds to cause impurities in later oilseed rape crops. London, Department of Environment, Food and Rural Affairs: 2 str.
http://www.infogm.org/spip.php?page=imprimer&id_article=1310 (september 2010)
- Squire G. R., Marshall B., Dunlop G., Wright G. 1997. Genetic basis of rate-temperature characteristics for germination in oilseed rape. *Journal of Experimental Botany*, 48: 869–875
- Schlink S. 1995. Überdauerungsvermögen und Dormanz von Rapssamen (*Brassica napus* L.) im Boden. V: *Challenges for Weed Science in a Changing Europe*. Budapest, European Weed Research Society: 65–72
- Stein J. C., Howlet B., Boyes D. C., Nasrallah J. B., Nasrallah M. E. 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*, 88: 8816–8820

- Stevens J. P., Kay Q. O. N. 1989. The number, dominance relationships and frequencies of self-incompatibility alleles in a natural population of *Sinapis arvensis* L. in South Wales. *Heredity*, 62: 199–205
- Stump W. L., Westra P. 2000. The seedbank dynamics of feral rye (*Secale cereale*). *Weed Technology*, 14: 7–14
- Sutherland J. P., Justinova L., Poppy G. M. 2006. The responses of crop-wild *Brassica* hybrids to simulated herbivory and interspecific competition: Implicants for transgene introgression. *Environmental Biosafety Research*, 5: 15–25
- Suwabe K., Iketani H., Nunome T., Kage T. 2002. Isolation and characterization of microsatellites in *B. rapa*. *Theoretical Applied Genetics*, 104: 1092–1098
- Suzuki G., Kai N., Hirose T., Fukui K., Nishio T., Takayama S., Isogai A., Watanabe M., Hinata K. 1999. Genomic organization of the S locus: Identification and characterization of genes in SLG/SRK region of S9 haplotype of *Brassica campestris* (syn. *rapa*). *Genetics*, 153: 391–400
- Syvanen M. 1985. Cross-species gene transfer: implications for a new theory of evolution. *Journal of Theoretical Biology*, 112: 333–343
- Szewc-McFadden A. K., Kresovich S., Bliet S. M., Mitchell S. E., McFerson J. R. 1996. Identification of polymorphic, conserved simple sequence repeats (SSRs) in cultivated *Brassica* species. *Theoretical Applied Genetics*, 93: 534–538
- Štajner N. 2010. Mikrosatelitski markerji uporabni za identifikacijo kultivarjev vinske trte (*Vitis vinifera* L.). *Acta Agriculturae Slovenica*, 95: 183–192
- Šuštar Vozlič J., Rostohar K., Blejec A., Kozjak P., Čergan Z., Meglič V. 2010. Development of sampling approaches for the determination of the presence of genetically modified organisms at the field level. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396: 2031–2041
- Takahashi N., Hayano T., Suzuki M. 1989. Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature*, 337: 473–475
- Tommasini L., Batley J., Arnold G. M., Cooke R. J., Donini P., Lee D., Law J. R., Lowe C., Moule C., Trick M., Edwards K. J. 2003. The development of multiplex simple sequence repeat markers (SSR) to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties. *Theoretical Applied Genetics*, 106: 1091–1101
- Trandinh C. C., Pao G. M., Saier M. H. Jr. 1992. Structural and evolutionary relationships among the immunophilins: two ubiquitous families of peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerases. *FASEB Journal*, 6: 3410–3420
- Treu R., Emberlin J. 2000. Pollen dispersal of the crops Maize (*Zea mays*), Oilseed rape (*Brassica napus*), Potatoes (*Solanum tuberosum*), Sugar beet (*Beta vulgaris*) and Wheat (*Triticum aestivum*). Bristol, University College, Soil Association: 54 str.
- Uyenoyama M. K. 1995. A generalized least-square estimate for the origin of sporophytic self-incompatibility. *Genetics*, 139: 975–992

- Uzanova M. I., Ecke W. 1999. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in oilseed rape (*B. napus* L.). *Plant Breeding*, 118: 323–236
- Wagner H. W., Sefc K. M. 1999. *IDENTITY 1.0*. Vienna, University of Agricultural Sciences, Centre for Applied Genetics: 5 str.
<http://www.uni-graz.at/~sefcck/manual.pdf> (januar 2011)
- Wang F., Wang X., Chen X., Xiao Y., Li H., Zhang S., Xu J., Fu J., Huang L., Liu C., Wu J., Liu K. 2012. Abundance, marker development and genetic mapping of microsatellites from unigenes in *Brassica napus*. *Molecular Breeding*, 30: 731–744.
- Wang N., Hu J., Ohsawa R., Ohta M. Fujimura T. 2007. Identification and characterization of microsatellite markers derived from expressed sequence tags (ESTs) of radish (*Raphanus sativus* L.). *Molecular Ecology Notes*, 7: 503–506
- Wang P., Heitman J. 2005. The cyclophilins. *Genome Biology*, 6: 226.0–226.6
- Wareing P. F., Saunders P. F. 1971. Hormones and dormancy. *Annual Reviews of Plant Physiology*, 22: 261–288
- Warwick S. I., Simard M. J., Légère A., Beckie H. J., Braun L., Zhu B., Mason P., Séguin-Swartz G., Stawart C. N. 2003. Hybridization between transgenic *Brassica napus* L. and its wild relatives: *Brassica rapa* L., *Raphanus raphanistrum* L., *Sinapis arvensis* L. and *Erucastrum galicum* (Willd.) O.E. Schulz. *Theoretical Applied Genetics*, 107: 528–539
- Weber E., Schmid B. 1998. Latitudinal population differentiation in two species of *Solidago* (Asteraceae) introduced into Europe. *American Journal of Botany*, 85, 9: 1110–1121
- Weber S., Ünker F., Friedt W. 2005. Improved doubled haploid production protocol for *Brassica napus* microspore colchicine treatment in vitro and ploidy determination by flow cytometry. *Plant Breeding*, 124: 511–513
- Weber J. L., Wong C. 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics*, 2: 1123–1128
- Westermeier P., Wenzel G., Mohler V. 2009. Development and evaluation of single-nucleotide polymorphism markers in allotetraploid rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theoretical Applied Genetics*, 119: 1301–1311
- Wolf C., Scherzinger M., Wurz A., Pauli U., Hübner., Lüthy L. 2000. Detection of cauliflower mosaic virus by the polymerase chain reaction: testing of food components for false-positive 35S-promoter screening results. *European Food Research Technology*, 210: 367–372
- Woloszynska M., Bocer T., Mackiewicz P., Janska H. 2004. A fragment of chloroplast DNA was transferred horizontally, probably from non-eudicots, to mitochondrial genome of *Phaseolus*. *Plant Molecular Biology*, 56: 811–820
- Wright S. 1946. Isolation by distance under diverse systems of mating. *Genetics*, 31: 39–59
- Wright S. 1951 The genetical structure of populations. *Annual Eugenics*, 15: 323–354

- Wright S. 1965. The interpretation of population structure by F-Statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19: 395–420
- Yuan M., Zhou Y., Liu D. 2004. Genetic diversity among populations and breeding lines from recurrent selection in *Brassica napus* as revealed by RAPD markers. *Plant Breeding*, 123: 9–12
- Zakon o soobstoju gensko spremenjenih rastlin z ostalimi kmetijskimi rastlinami. Ur. l. RS, št. 41/09
- Zhu Y. M., Li Y. D., Colbach N., Ma K. P., Wei W., Mi X. C. 2012. Seed losses at harvest and seed persistence of oilseed rape (*Brassica napus*) in different cultural conditions in Chinese farming systems. *Weed Research*, 52: 317–326

ZAHVALA

Hvala mentorju izr. prof. dr. Vladimirju Megliču, da me je sprejel za mlado raziskovalko ter za raziskovalno svobodo in usmeritve pri delu. Še posebej sem mu hvaležna, da me je v času mentorstva vključil v različne projekte in raziskovalna področja rastlinske genetike, s pomočjo katerih sem se ogromno naučila. Zahvaljujem se mu tudi kot predstojniku, ki je znal razumeti mojo hkratno vlogo raziskovalke in mamice.

Zahvaljujem se vsem članom komisije za pregled doktorske disertacije in za vse diskusije ter koristne predloge. Zahvala velja tudi Javni agenciji za raziskovalno dejavnost za financiranje podiplomskega študija.

Hvala vsem sodelavcem (bivšega) oddelka za poljedelstvo in semenarstvo za vso strokovno in moralno podporo v času izvajanja doktorske disertacije. Še posebej hvaležna sem Jelki Šuštar Vozlič, Romani Rutar, Tatjani Kavar, Marku Marasu, Beti Komatar, Andreju Obalu, Dragu Žitku, Katarini Pilihi in Mateju Knapiču. Hvala tudi vsem uporabnikom genetskega laboratorija na Kmetijskem inštitutu Slovenije za vedno zanimive in konstruktivne pogovore, za katere se še posebej zahvaljujem Ireni Mavrič Pleško. Zahvala velja tudi Andreju Razpetu iz oddelka za zootehniko v Grobljah, kjer smo izvajali fragmentno analizo vzorcev. Prav tako se zahvaljujem svojim sodelavkam, s katerimi smo si delile pisarno, za vse prijetne pogovore in odlično vzdušje, ki je vsekakor pozitivno vplivalo na delovno vnemo.

Posebna zahvala velja mojim staršem, Ivanu in Vidi Janhar, družinama mojih bratov Simona in Mihe, Gašperjevim staršem in njegovi sestri Mojci, ki so me ves čas podpirali in mi bili vedno pripravljeni kakor koli pomagati.

Doktorska disertacija je nastajala v obdobju, ko so se mi zgodile najlepše in najhujše stvari, ki se lahko zgodijo v življenju ženske. Prav zato velja največja zahvala mojemu možu Gašperju, ki mi nudi vsestransko podporo, in sinčku Tilnu, ki je moj vir veselja, optimizma in energije. Srčna zahvala pa naj v drugo dimenzijo izven prostora in časa doseže tudi sinčka Urbana[†], ki me je v svojem kratkem življenju naučil, kaj resnično pomeni biti srečen in kaj pomeni zares trpeti.

PRILOGA A

Temperaturne nastavitve v kvalitativni PCR-analizi za preverjanje prisotnosti endogenega gena oljne ogrščice (kruciferina) in štirih presejalnih genskih elementov – EPSPS, p35S, tNos in *bar*.

Temperature appointment in kvalitative PCR analysis for persistence of endogene gene of oilseed rape (cruciferin) and four screening genetic elements; EPSPS, p35S, tNos in *bar*.

	KRUCIFERIN	EPSPS	p35S	tNOS	BAR
Začetna denaturacija	94 °C za 5 min	95 °C za 10 min	95 °C za 10 min	95 °C za 10 min	95 °C za 10 min
Denaturacija	94 °C za 1 min	94 °C za 20 sek	94 °C za 20 sek	94 °C za 30 sek	94 °C za 20 sek
Prileganje	60 °C za 1 min	54 °C za 40 sek	55 °C za 40 sek	62 °C za 40 sek	60 °C za 40 sek
Namnoževanje	72 °C za 1 min	72 °C za 1 min	72 °C za 1 min	72 °C za 1 min	72 °C za 1 min
Število ciklov	35	40	35	35	35
Končna inkubacija	72 °C za 7 min	72 °C za 3 min	72 °C za 3 min	72 °C za 10 min	72 °C za 3 min
Ohlajanje in vzdrževanje	4 °C	4 °C	4 °C	4 °C	4 °C

PRILOGA B

Lokacije terenskega vzorčenja vrste *B. napus* po celotni Sloveniji v letu 2007.
Sampled locations of *B. napus* around Slovenia in 2007.

Lokacija	Lab. št.	x	y	Status rastline
01/07b Dornova	2	573711,00	142770,00	samosevec
01/07c Dornova	3	573741,00	142857,00	samosevec
02/07b Cvetkovci	5	579301,00	141426,00	samosevec
03/07b Odranci	7	597070,00	159924,00	samosevec
04/07b OD-Lipa	9	598756,00	161987,00	samosevec
05/07b Turnišče	11	599941,00	164524,00	samosevec
06/07b Geneterovci	13	603922,00	164142,00	samosevec
07/07b Čikečka	15	602265,00	175371,00	samosevec
08/07b Strukovci	17	581452,00	175159,00	samosevec
09/07 Goričane	18	453737,00	112571,00	samosevec
10/07 Trata	19	449860,00	114653,00	samosevec
12/07 Milje	20	454138,00	124718,00	samosevec
13/07b Šenčur	22	454346,00	122063,00	samosevec
14/07 Meja	23	451884,00	115863,00	samosevec
16/07 Krka	25	456202,00	109501,00	samosevec
18/07b Šentjernej	29	527571,00	77916,00	samosevec
19/07b V. Mraševo	31	527534,00	77927,00	samosevec
20/07b Cerklje ob Krki	33	542074,00	82879,00	samosevec
20/07c Cerklje ob Krki	34	542088,00	82868,00	samosevec
21/07b Brežice	36	542027,00	82858,00	samosevec
22/07b Župljevec	38	552673,00	89952,00	samosevec
23/07b Žadovinek	40	539474,00	87436,00	samosevec
24/07b Dob (Zapor)	42	539475,00	87445,00	samosevec
26/07b Struževo	44	449748,00	123472,00	samosevec
33/07 Kropivšek	51	487484,00	114413,00	samosevec
34/07b Parižlje	52	504741,00	125967,00	samosevec
34/07bb Parižlje	53	504741,00	125967,00	samosevec
35/07 Šmarje	54	534819,00	119129,00	samosevec
01/07a Dornova	1	573744,00	142839,00	posevek
02/07a Cvetkovci	4	579272,00	141449,00	posevek
03/07a Odranci	6	597046,00	159911,00	posevek
04/07a OD-Lipa	8	598742,00	161964,00	posevek
05/07a Turnišče	10	599943,00	164528,00	posevek
06/07a Geneterovci	12	603927,00	164152,00	posevek
07/07a Čikečka	14	602268,00	175349,00	posevek
08/07a Strukovci	16	581452,00	175173,00	posevek
13/07a Šenčur	21	454481,00	122326,00	posevek
17/07a Mihovica (Roje)	26	524814,00	79779,00	posevek
17/07aa Mihovica (Roje)	27	524818,00	79757,00	posevek
18/07a Šentjernej	28	527522,00	77898,00	posevek
19/07a V. Mraševo	30	537085,00	81619,00	posevek
20/07a Cerklje ob Krki	32	537089,00	81601,00	posevek
21/07a Brežice	35	542027,00	82858,00	posevek
22/07a Župljevec	37	553258,00	90585,00	posevek
23/07a Žadovinek	39	539479,00	87458,00	posevek
24/07a Dob (Zapor)	41	539475,00	87445,00	posevek
26/07a Struževo	43	449599,00	123636,00	posevek
15/07 Medno	24	456208,00	109833,00	podivjana
27/07 Brnik	45	458417,00	121075,00	podivjana
28/07 Žeje	46	456487,00	116510,00	podivjana
29/07 Vrhnika	47	443254,00	90132,00	podivjana
30/07 Postojna	48	438899,00	70106,00	podivjana
31/07 Razdrto	49	427124,00	66879,00	podivjana
32/07 Prevoje	50	473797,00	113108,00	podivjana

PRILOGA C

Lokacije terenskega vzorčenja vrste *B. napus* po celotni Sloveniji v letu 2008.
Sampled locations of *B. napus* around Slovenia in 2008.

Lokacija	Lab. št.	x	y	Status rastle
42/08 Lukež	96	85886,04	546529,03	samosevec
48/08 Podvinci B	102	144181,37	571561,72	samosevec
52/08 Jamna	106	158251,30	578909,21	samosevec
01/08 Podgorica	55	105018,44	468055,04	podivjana
02/08 Šentvid pri Lukovici	56	113308,00	475659,07	podivjana
03/08 Kompolje	57	114147,20	479669,98	podivjana
04/08 Petelinjek	58	114747,75	486912,86	podivjana
05/08 Čeplje	59	122902,56	498547,74	podivjana
06/08 Prekopa	60	122707,83	500430,39	podivjana
07/08 Kapla	61	122671,00	501886,45	podivjana
08/08 Latkova vas	62	123040,91	506629,48	podivjana
09/08 Čopova	63	123611,39	512616,69	podivjana
10/08 Brvače	64	91141,64	472383,64	podivjana
11/08 Lobček	65	87788,74	476415,26	podivjana
12/08 Adamičeva	66	90241,56	474482,90	podivjana
13/08 Grosuplje	67	90941,81	472748,32	podivjana
14/08 Malo Črnelo	68	85683,38	484992,01	podivjana
15/08 Prapreče	69	77088,06	493943,00	podivjana
16/08 Novo Naselje	70	99885,13	468121,08	podivjana
17/08 Toyota	71	102612,38	465628,71	podivjana
18/08 Miheličeva	72	106850,45	459052,73	podivjana
19/08 Nasip Brod	73	107028,26	459333,53	podivjana
20/08 Draveljska gmajna	74	103451,72	458706,37	podivjana
21/08 Log	75	96233,52	451058,89	podivjana
22/08 Senožče	76	66203,33	426570,12	podivjana
23/08 Črni Kal	77	47127,48	412295,33	podivjana
24/08 Stanežiče	78	107221,61	457863,40	podivjana
25/08 Pirniče	79	112349,39	457036,20	podivjana
26/08 Lipa	80	110373,77	457429,25	podivjana
27/08 Reteče	81	112955,15	451355,86	podivjana
28/08 Trboje	82	115122,30	455771,49	podivjana
29/08 Kokrica	83	125290,30	451206,26	podivjana
30/08 Žeje	84	116509,84	463298,61	podivjana
31/08 Gameljne	85	109804,28	460012,70	podivjana
32/08 Vodice	86	116427,42	461058,29	podivjana
33/08 Vodiški ovinki	87	117877,08	460896,49	podivjana
34/08 Potok	88	117971,19	463645,68	podivjana
35/08 Naklo	89	124940,22	448285,71	podivjana
36/08 Radovljica-Spar	90	134050,76	437126,24	podivjana
37/08 Vrbnje	91	133521,08	437649,37	podivjana
38/08 Gorenc	92	123621,52	449573,71	podivjana
39/08 Čirče	93	120956,44	451543,05	podivjana
40/08 Žabnica	94	117560,64	448841,76	podivjana
41/08 Trnje	95	84158,89	547414,94	podivjana
43/08 Dol, Brezovo	97	94653,58	528043,62	podivjana
44/08 Sevnica-Mokronog	98	93746,60	519475,28	podivjana
45/08 Tržišče	99	90788,57	514786,13	podivjana
46/08 Martinja vas	100	89618,60	510525,07	podivjana
47/08 Podvinci A	101	144181,36	571561,71	podivjana
49/08 Pacinje	103	145719,57	572696,13	podivjana
50/08 Juršinci 1	104	149312,12	574543,49	podivjana
51/08 Juršinci 2	105	151077,07	574635,74	podivjana
53/08 Slaptinci	107	159136,05	582462,69	podivjana
54/08 Beltinci	108	164514,21	595524,32	podivjana
55/08 Gančani 1	109	165722,46	595414,61	podivjana
56/08 Gančani 2	110	166071,84	596297,51	podivjana

Se nadaljuje.

Nadaljevanje.

Lokacija	Lab. št.	x	y	Status rastline
57/08 Ivanci	111	168713,70	597767,37	podivjana
58/08 Terme 3000	112	172014,67	593966,17	podivjana
59/08 Sv. Ana	113	168111,28	566689,92	podivjana
60/08 Biš	114	155357,90	567432,53	podivjana
61/08 Gomilci	115	149995,39	568687,19	podivjana
62/08 Nova vas	116	145614,94	568955,60	podivjana
63/08 Maistrova ulica	117	143750,90	566261,14	podivjana
64/08 Duplek	118	153528,15	554373,08	podivjana
65/08 Rakek	119	74440,25	447202,74	podivjana

PRILOGA D

Lokacije terenskega vzorčenja vrste *B. napus* po celotni Sloveniji v letu 2009.
Sampled locations of *B. napus* around Slovenia in 2009.

Lokacija	Lab. št.	x	y	Status rastline
01/09 Pragarsko	120	140775,19	555491,13	samosevec
05/09 Cunkovci	124	141943,60	575490,19	samosevec
08/09 Podgradje	127	152262,41	592715,19	samosevec
09/09 Gor. Bistrica	128	157641,59	598121,23	samosevec
12/09 Dolga vas	131	161442,36	610977,66	samosevec
18/09 Morje	137	144379,10	549167,33	samosevec
25/09 G. Gradišče	144	77891,21	523376,41	samosevec
26/09 Cerklje ob Krki	145	82693,98	542265,92	samosevec
34/09 Reteče	153	113313,64	451096,38	samosevec
35/09 Qulandia	154	121341,23	452030,75	samosevec
42/09 Olševik	161	125326,43	457498,64	samosevec
43/09 Lahovče	162	119232,50	461627,89	samosevec
47/09 Vodice	166	115584,06	461544,68	samosevec
52/09 Mengeš	171	110878,87	469027,76	samosevec
54/09 Savlje	173	106084,25	461042,50	samosevec
55/09 Nemška cesta	174	106805,12	461290,62	samosevec
59/09 Sostro	178	99825,83	468553,68	samosevec
65/09 Kapla	184	122656,72	502427,23	samosevec
02/09 Krožni Kidričevo	121	141206,68	562417,56	podivjana
03/09 Hajdina	122	139221,66	566138,83	podivjana
04/09 Spuhlja	123	141466,89	570585,34	podivjana
06/09 Mihovci	125	141853,62	585354,90	podivjana
07/09 Libanja	126	144190,77	590391,04	podivjana
10/09 Via Lendava	129	156922,04	601019,28	podivjana
11/09 Via Lendava 2	130	157628,07	605653,13	podivjana
13/09 Kamovci	132	165424,47	607121,99	podivjana
14/09 Gornja Radgona	133	169993,51	576675,79	podivjana
15/09 Plitvički vrh	134	169157,08	571468,15	podivjana
16/09 Lormanje	135	159290,91	562919,19	podivjana
17/09 Maribor	136	154106,43	553902,99	podivjana
19/09 Dolnji kot	138	72798,20	498674,23	podivjana
20/09 Suhor	139	64445,76	503016,31	podivjana
21/09 Stare Žage	140	61894,64	506687,50	podivjana
22/09 Semič	141	53407,28	513065,43	podivjana
23/09 Podzemelj	142	52125,73	521538,91	podivjana
24/09 Metlika	143	66392,17	517260,97	podivjana
27/09 Malence	146	83324,25	545889,05	podivjana
28/09 Brežice	147	85125,06	546971,28	podivjana
29/09 Gornji Lenart	148	87248,80	545447,48	podivjana
30/09 Stari grad	149	89367,85	542067,86	podivjana
31/09 Gornje Pijavsko	150	93643,91	532926,81	podivjana
32/09 Bruna vas	151	90344,39	512576,97	podivjana
33/09 Puščava	152	90435,97	509677,77	podivjana
36/09 Planet Tuš	155	121342,36	452028,45	podivjana
37/09 Strahinj	156	126791,50	445874,69	podivjana
38/09 Radovljica	157	133069,27	438206,49	podivjana
39/09 Lesce	158	136307,31	435323,11	podivjana
40/09 Struževo	159	123056,10	449982,33	podivjana
41/09 Golnik	160	131253,81	449280,42	podivjana
44/09 Šenčur	163	121843,46	454813,52	podivjana
45/09 Smlednik	164	114822,24	456021,54	podivjana
46/09 Medno	165	108553,86	457067,72	podivjana
48/09 Sinja Gorica	167	93388,58	447164,35	podivjana
49/09 Logatec	168	86107,16	439797,91	podivjana

Se nadaljuje.

Nadaljevanje.

Lokacija	Lab. št.	x	y	Status rastline
50/09 Raubarkomanda	169	71992,65	440259,69	podivjana
51/09 Postojna	170	69936,20	438246,32	podivjana
53/09 Kolosej	172	102577,90	465632,64	podivjana
56/09 Podutik	175	103452,53	458314,45	podivjana
57/09 Rudnik	176	97383,16	463131,13	podivjana
58/09 Bizovik	177	99529,28	467038,17	podivjana
60/09 Tuš Mengeš	179	112664,70	467169,25	podivjana
61/09 Vir	180	112020,46	470571,50	podivjana
62/09 Prevoje	181	112966,75	473115,48	podivjana
63/09 Sp. Loke	182	114058,45	482851,29	podivjana
64/09 Čeplje	183	122897,74	498564,96	podivjana
66/09 Šentjur	185	119214,09	532152,24	podivjana
67/09 Grobelno	186	118976,27	534421,91	podivjana
68/09 Mestinje	187	121436,10	543880,26	podivjana
69/09 Belo	188	120598,43	543466,60	podivjana
70/09 Senovica	189	120795,69	538362,63	podivjana
71/09 Klanec (pri Kom.)	190	118923,04	464071,88	podivjana

PRILOGA E

Lokacije terenskega vzorčenja rastlin vrste *B. napus* po celotni Sloveniji v letu 2010.
Sampled locations of *B. napus* around Slovenia in 2010.

Lokacija	Lab. št.	x	y	Status rastline
01/10 Kraberk	250	128670,86	534673,56	podivjana
02/10 Draža vas	251	131990,36	537242,60	podivjana
04/10 Slov. Konjice	253	133153,39	533860,00	podivjana
06/10 Kidričevo	255	141190,15	562540,75	podivjana
20/10 Ptuj	256	141733,02	566367,63	podivjana
08/10 Radehova	258	158706,40	564735,31	podivjana
09/10 Benedikt	259	162515,19	568509,45	podivjana
11/10 Boreci	261	158093,54	587864,80	podivjana
12/10 Beltinci	262	162770,01	591062,01	podivjana
13/10 Lipovci	263	164711,73	592930,23	podivjana
14/10 Svit	264	157461,83	598005,26	podivjana
16/10 Ljutomer	266	152137,33	592459,18	podivjana
17/10 Libanja	267	144776,26	589989,63	podivjana
18/10 Ormož	268	141152,06	587000,32	podivjana
21/10 Želodnik	270	112564,50	472351,37	podivjana
22/10 Ločica	271	121043,85	496192,76	podivjana
24/10 Kapla	273	122665,57	502308,49	podivjana
25/10 Latkova vas	274	122988,64	506606,14	podivjana
27/10 Šentjur	276	119244,93	531884,35	podivjana
28/10 Grobelno	277	120033,71	535862,47	podivjana
29/10 Dole	278	121986,21	529973,04	podivjana
30/10 Poč. Lopata	279	124284,39	517444,12	podivjana
31/10 Vin. cesta	280	132448,54	513660,39	podivjana
32/10 Velenje	281	133557,20	509092,80	podivjana
34/10 Bistrica	283	119977,23	494365,34	podivjana
36/10 Mengeš	285	113266,16	467553,23	podivjana
39/10 Mrzlo Polje	288	87647,32	485242,67	podivjana
41/10 Fužina	290	80058,27	486954,98	podivjana
42/10 Prapreče	291	77059,83	494009,78	podivjana
43/10 Suhor	292	68278,73	502905,69	podivjana
44/Stare Žage	293	61163,83	507104,13	podivjana
46/10 Lokve	295	50256,42	513983,91	podivjana
48/10 Podzemelj	297	52135,74	521542,00	podivjana
49/10 Težka voda	298	69116,50	515715,01	podivjana
51/10 Maharovec	300	77728,38	524107,94	podivjana
52/10 Kostanjevica	301	78161,01	532304,28	podivjana
53/10 Mraševo	302	80552,25	535489,14	podivjana
54/10 Brežice	303	84230,13	547234,89	podivjana
55/10 Trebež	304	89027,33	544713,38	podivjana
56/10 Krško	305	87821,62	537881,28	podivjana
57/10 Trebnje	306	83982,34	503178,26	podivjana
58/10 Škofije	307	88517,91	490646,84	podivjana
59/10 Litija	308	101459,51	486295,21	podivjana
60/10 Šenčur	309	121550,93	455597,28	podivjana
61/10 tuš Kranj	310	121470,83	452088,08	podivjana
63/10 Bled	312	136201,48	435553,60	podivjana
64/10 Struževo	313	123099,35	449993,49	podivjana
85/10 Torovo	314	115447,50	459968,09	podivjana
86/10 Žeje	315	116806,72	464465,39	podivjana
88/10 Nasovče	317	118462,40	463040,55	podivjana
89/10 Vopovlje	318	120260,56	461110,57	podivjana
67/10 Rudnik	323	97004,60	464949,34	podivjana
68/10 Avtotehna	324	97131,39	464548,19	podivjana
69/10 Črna vas	325	96424,72	461921,13	podivjana
70/10 Vič	326	99896,25	459755,40	podivjana
71/10 Večna pot	327	101084,60	460232,93	podivjana

Se nadaljuje.

Nadaljevanje.

Lokacija	Lab. št.	x	y	Status rastline
72/10 Krtina	328	116312,42	492712,32	podivjana
73/10 Zagorje	329	108540,11	499728,08	podivjana
74/10 Kisovec	330	111049,41	496996,58	podivjana
75/10 Barje	331	98393,06	460345,52	podivjana
76/10 Tržaška cesta	332	98354,59	456670,19	podivjana
78/10 Logatec	334	86104,87	439804,86	podivjana
79/10 Hrenoviče	335	70240,80	433722,65	podivjana
80/10 Koper	336	46530,66	405823,98	podivjana
81/10 Ankaranska cesta	337	45255,25	402304,86	podivjana
82/10 Metjna vas	338	63404,51	437330,20	podivjana
83/10 Rakek	339	73412,25	448245,97	podivjana
84/10 Podsmreka	340	100212,32	456131,49	podivjana
15/10 Veščice	265	153670,89	597118,71	podivjana
26/10 Štore	275	120223,49	524156,71	podivjana
47/10 Črnomelj	296	49117,11	516660,52	podivjana
62/10 Reteče	311	112961,76	453310,26	podivjana
90/10 Cerklje	319	122954,56	461147,06	podivjana
03/10 Žiče	252	130445,57	536346,29	samosevec
05/10 PP via Ptuj	254	140175,61	533821,23	samosevec
07/10 Janezovski vrh	257	148063,68	568383,10	samosevec
10/10 Rihtarovci	260	165817,38	581311,37	samosevec
23/10 Vransko	272	121343,89	496263,91	samosevec
33/10 Polzela	282	125746,41	506863,76	samosevec
35/10 Homec	284	115473,21	469106,70	samosevec
37/10 Rodica	286	112121,10	461135,06	samosevec
38/10 Savlje	287	104989,09	461629,45	samosevec
40/10 Vodotučine	289	84987,53	484894,87	samosevec
45/10 Semič	294	53780,42	512936,01	samosevec
50/10 Petelinjek	299	74545,60	517043,59	samosevec
87/10 Moste	316	116471,47	465750,18	samosevec
91/10 Meja	320	116367,53	452282,62	samosevec
65/10 Zadobrova	321	103864,40	468196,22	samosevec
66/10 Sostro	322	99735,16	468898,42	samosevec
77/10 Lesno Brdo	333	95553,98	449646,87	samosevec

PRILOGA F

Lokacije terenskega vzorčenja v Sloveniji, na katerih je vzorčenje predstavnikov vrste *B. napus* potekalo več kot enkrat v obdobju 2007–2010.

Sampled locations in Slovenia, where field survey of representatives of *B. napus* was performed more than once in the period 2007-2010.

Lokacija	Lab. št.	Oznaka	x	y	Status
23/09 Podzemelj	142	2309p-PODZ	52125,73	521538,91	podivjana
48/10 Podzemelj	297	4810p-PODZ	52135,74	521542,00	podivjana
78/10 Logatec	334	7810p-LOGA	86104,87	439804,86	podivjana
49/09 Logatec	168	4909p-LOGA	86107,16	439797,91	podivjana
30/08 Žeje	84	3008p-ŽEJE	116509,84	463298,61	podivjana
86/10 Žeje	315	8610p-ŽEJE	116806,72	464465,39	podivjana
65/09 Kapla	184	6509s-KAPL	122656,72	502427,23	samosevec
24/10 Kapla	273	2410p-KAPL	122665,57	502308,49	podivjana
07/08 Kapla	61	0708p-KAPL	122671,00	501886,45	podivjana
64/09 Čeplje	183	6409p-ČEPL	122897,74	498564,96	podivjana
05/08 Čeplje	59	0508p-ČEPL	122902,56	498547,74	podivjana
40/09 Struževo	159	4009p-STRU	123056,10	449982,33	podivjana
64/10 Struževo	313	6410p-STRU	123099,35	449993,49	podivjana
26/07b Struževo	44	2607s-STRU	449748,00	5123472,00	samosevec
06/10 Kidričevo	255	0610p-KIDR	141190,15	562540,75	podivjana
02/09 Krožni Kidričevo	121	0209p-KIDR	141206,68	562417,56	podivjana

PRILOGA G

Lokacije terenskega vzorčenja SKS-jev vrste *B. napus* po celotni Sloveniji v letih 2008 in 2010.
Sampled locations of SKR of *B. napus* around Slovenia in 2008 and 2010.

Lokacija	Lab. št	x	y	sorodnik
DS2 A/08 Spodnje Loke	DS2/08	113569,27	482007,91	<i>Brassica rapa</i> 19*
DS4/08 Blagovica	DS4/08	114669,93	485309,31	<i>Brassica rapa</i> 21*
DS8/08 Malo Črnelo	DS8/08	85683,38	484992,01	<i>Brassica rapa</i> 25*
DS9/08 Novo mesto	DS9/08	76370,81	512445,34	<i>Brassica rapa</i> 26*
DS1/08 Želodnik	DS1/08	112618,60	473093,34	<i>Sinapis arvensis</i> 10*
DS19/08 Lahovče	DS19/08	119607,07	461803,84	<i>Sinapis arvensis</i> 12*
DS20/08 Radovljica	DS20/08	133957,45	437371,60	<i>Sinapis arvensis</i> 13*
DS21/08 Radovljica-Spar	DS21/08	134050,76	437126,24	<i>Sinapis arvensis</i> 15*
DS22/08 Čirče	DS22/08	120956,44	451543,05	<i>Sinapis arvensis</i> 16*
DS23/08 Mostec	DS23/08	84065,57	548997,40	<i>Sinapis arvensis</i> 17*
DS24/08 Martinja vas	DS24/08	89618,60	510525,07	<i>Sinapis arvensis</i> 18*
DS1/10 Bertoki	DS1/10	45823,22	403740,60	<i>Sinapis arvensis</i> 2*
DS5/08 Čepļe	DS5/08	114669,93	485309,31	<i>Sinapis arvensis</i> 22*
DS6/08 Čopova-Žalec	DS6/08	123611,39	512616,69	<i>Sinapis arvensis</i> 23*
DS7/08 Celje	DS7/08	121453,28	519116,18	<i>Sinapis arvensis</i> 24*
DS16/08 Vradno	DS16/08	98015,90	455388,24	<i>Sinapis arvensis</i> 27*
DS10/08 Odcep Ždinja vas	DS10/08	77107,46	513086,05	<i>Sinapis arvensis</i> 28*
DS2 B/08 Spodnje Loke	DS3/08	113569,28	482007,92	<i>Sinapis arvensis</i> 29*
DS11/08 Zaloška	DS11/08	101205,01	467933,21	<i>Sinapis arvensis</i> 3*
DS15/08 Kemofarmacija B	DS15/08	100489,95	458945,66	<i>Sinapis arvensis</i> 30*
DS18/08 Divača	DS18/08	60632,74	420557,60	<i>Sinapis arvensis</i> 31*
DS2/10 Črnuče	DS2/10	105520,51	462865,39	<i>Sinapis arvensis</i> 32*
DS12/08 Letališka	DS12/08	102070,78	466086,02	<i>Sinapis arvensis</i> 4*
DS13/08 Nemška	DS13/08	106821,11	460128,47	<i>Sinapis arvensis</i> 5*
DS14/08 Kemofarmacija A	DS14/08	100489,95	458945,66	<i>Sinapis arvensis</i> 6*
DS17/08 Opel	DS17/08	93705,21	447439,80	<i>Sinapis arvensis</i> 9*

PRILOGA H

Lokacije zbiranja samosevnih in podivjanih populacij vrste *B. napus* v letih 2007 in 2008, ki so bile vključene v analizo prisotnosti gensko spremenjenih organizmov v Sloveniji.
Sampled locations of volunteer and feral populations of *B. napus* in 2007 and 2008, which were included in analysis of GMO persistence in Slovenia.

Lab. št.	Lokacija – krajše	Lokacija	x	y
8	01/07b	01/07b Dornova	15-73.711	51-42.770
9	01/07c	01/07c Dornova	15-73.741	51-42.857
10	02/07b	02/07b Cvetkovci	15-79.301	51-41.426
11	03/07b	03/07b Odranci	15-97.070	51-59.924
12	04/07b	04/07b Od-Lipa	15-98.756	51-61.987
13	05/07b	05/07b Turnišče	15-99.941	51-64.524
14	06/07b	06/07b Geneterovci	16-03.922	51-64.142
15	07/07b	07/07b Čikečka	16-02.265	51-75.371
16	08/07b	08/07b Strukovci	15-81.425	51-75.159
17 = 51	01/08	01/08 Podgorica	14-34.927	46-05.314
18 = 52	02/08	02/08 Šentvid pri Luk.	14-40.801	46-09.808
19 = 53	03/08	03/08 Kompolje	14-43.915	46-10.269
20 = 54	04/08	04/08 Petelinjek	14-49.542	46-10.604
21 = 55	05/08	05/08 Čepļje	14-58.582	46-15.014
22 = 56	06/08	06/08 Prekopa	15-00.047	46-14.909
23 = 57	07/08	07/08 Kapla	15-01.180	46-14.889
24 = 58	08/08	08/08 Latkova vas	15-04.871	46-15.087
25	09/07	09/07 Goričani	14-53.737	51-12.571
26	10/07	10/07 Trata	14-49.860	51-14.653
27	12/07	12/07 Milje	14.54.138	51.24.718
28	13/07b	13/07b Šenčur	14-54.346	51-22.063
29	14/07b	14/07b Meja	14-51.884	51-15.841
30	15/07	15/07 Medno	14-56.208	51-09.433
31	16/07	16/07 Krka	14-56.202	51-09.501
32	18/07b	18/07b Šentjernej	15-27.517	50-77.916
33	19/07b	19/07b V. Mraševo	15-27.534	50-77.927
34	20/07b	20/07b Cerklje ob Krki	15-42.074	50-52.879
35	20/07c	20/07c Cerklje ob Krki	15-42.688	50-82.868
36	21/07b	21/07b Brežice	15-42.027	50-82.858
37	22/07b	22/07b Župljeverec	15-52.673	50-89.952
38	23/07b	23/07b Žadovinec	15-39.474	50-87.436
39	24/07b	24/07b Dob (zapor)	15-39.475	50-87.445
40	26/07b	26/07b Struževo	14-49.748	51-23.472
41	27/07	27/07 Brnik	14-58.417	51-21.075
42	28/07	28/07 Žeje	14-56.487	51-16.510
43	29/07	29/07 Vrhnika poč.	14-43.254	50-90.132
44	30/07	30/07 Postojna	14-38.899	50-70.106
45	31/07	31/07 Razdrto	14-27.124	50-66.879
46	32/07	32/07 Prevoje	14-73.797	51-13.108
47	33/07	33/07 Kropivšek	14-87.484	51-14.413
48	34/07b	34/07b Parižlje	15-04.741	51-25.967
49	34/07bb	34/07bb Parižlje	15-04.821	51-25.722
50	35/07	35/07 Šmarje	15-34.819	51-19.129
51 = 17	01/08	01/08 Podgorica	14-34.927	46-05.314
52 = 18	02/08	02/08 Šentvid pri Luk.	14-40.801	46-09.808
53 = 19	03/08	03/08 Kompolje	14-43.915	46-10.269
54 = 20	04/08	04/08 Petelinjek	14-49.542	46-10.604
55 = 21	05/08	05/08 Čepļje	14-58.582	46-15.014
56 = 22	06/08	06/08 Prekopa	15-00.047	46-14.909
57 = 23	07/08	07/08 Kapla	15-01.180	46-14.889
58 = 24	08/08	08/08 Latkova vas	15-04.871	46-15.087
59	09/08	09/08 Čopova	15-09.531	46-15.390
60	10/08	10/08 Brvače	14-38.334	45-57.834
61	11/08	11/08 Lobček	14-41.465	45-56.033

Se nadaljuje.

Nadaljevanje.

Lab. št.	Lokacija – krajše	Lokacija	x	y
62	12/08	12/08 Adamičeva	14-39.962	45-57.353
63	13/08	13/08 Grosuplje	14-38.617	45-57.727
64	14/08	14/08 Malo Črnelo	14-48.105	45-54.911
65	15/08	15/08 Prapreče	14-55.035	45-50.279
66	16/08	16/08 Novo naselje	14-34.999	46-02.543
67	17/08	17/08 Toyota	14-33.055	46-04.008
68	18/08	18/08 Miheličeva	14-27.933	46-06.274
69	19/08	19/08 Nasip Brod	14-28.150	46-06.371
70	20/08	20/08 Draveljska Gmajna	14-27.682	46-04.438
71	21/08	21/08 Log	14-21.795	46-00.511
72	22/08	22/08 Senožeče	14-03.100	45-44.169
73	23/08	23/08 Črni Kal	13-52.303	45-33.772
74	24/08	24/08 Stanežiče	14-27.008	46-06.470
75	25/08	25/08 Pirniče	14-26.338	46-09.235
76	26/08	26/08 Lipa	14-26.654	46-08.170
77	27/08	27/08 Reteče	14-21.922	46-09.539
78	28/08	28/08 Trboje	14-25.340	46-10.727
79	29/08	29/08 Kokrica	14-21.729	46-16.197
80	30/08	30/08 Žeje	14-31.183	46-11.503
81	31/08	31/08 Gameljne	14-28.663	46-07.872
82	32/08	32/08 Vodice	14-29.442	46-11.451
83	33/08	33/08 Vodiški ovinki	14-29.309	46-12.233
84	34/08	34/08 Potok	14-31.446	46-12.293
85	35/08	35/08 Naklo	14-19.458	46-15.995
86	36/08	36/08 Radovljica-Spar	14-10.699	46-20.856
87	37/08	37/08 Vrhnje	14-11.111	46-20.573
88	38/08	38/08 Gorenc	14-20.469	46-15.289
89	39/08	39/08 Čirče	14-22.018	46-13.859
90	40/08	40/08 Žabnica	14-19.939	46-12.014
91	41/08	41/08 Trnje	15-36.377	45-54.001
92	42/08	42/08 Lukež	15-35.702	45-54.937
93	43/08	43/08 Dol. Brezovo	15-21.435	45-59.730
94	44/08	44/08 Sevnica-Mokronog	15-14.796	45-59.258
95	45/08	45/08 Tržišče	15-11.159	45-57.668
96	46/08	46/08 Martinja vas	15-07.859	45-57.041
97	47/08	47/08 Podvinci A	15-55.589	46-26.275
98	48/08	48/08 Podvinci B	15-55.560	46-26.181
99	49/08	49/08 Pacinje	15-56.489	46-27.098
100	50/08	50/08 Juršinci	15-57.966	46-29.025
101	51/08	51/08 Juršinci 2	15-58.055	46-29.977
102	52/08	52/08 Jamna	16-01.468	46-33.820
103	53/08	53/08 Slaptinci	16-04.258	46-34.272
104	54/08	54/08 Beltinci	16-14.546	46-37.071
105	55/08	55/08 Gančani	16-14.475	46-37.724
106	56/08	56/08 Gančani 2	16-15.171	46-37.905
107	57/08	57/08 Ivanci	16-16.356	46-39.318
108	58/08	58/08 Terme 3000	16-13.417	46-41.132
109	59/08	59/08 Sv. Ana	15-51.991	46-39.221
110	60/08	60/08 Biš	15-52.462	46-32.333
111	61/08	61/08 Gomilci	15-53.369	46-29.431
112	62/08	62/08 Nova vas	15-53.567	46-27.065
113	63/08	63/08 Maistrova ulica	15-51.447	46-26.075
114	64/08	64/08 Duplek	15-42.234	46-31.416
115	65/08	65/08 Rakek	14-18.952	45-48.729