

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Mateja ZUPIN

**ODZIV NAVADNEGA FIŽOLA (*Phaseolus vulgaris* L.)
NA SUŠNI STRES: KVANTITATIVNO
KARTIRANJE LOKUSOV**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Mateja ZUPIN

**ODZIV NAVADNEGA FIŽOLA (*Phaseolus vulgaris* L.) NA SUŠNI
STRES: KVANTITATIVNO KARTIRANJE LOKUSOV**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**RESPONSE TO DROUGHT STRESS IN COMMON BEAN (*Phaseolus
vulgaris* L.): QTL MAPPING**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2017

Z doktorsko disertacijo zaključujem Interdisciplinarni doktorski študijski program Bioznanosti znanstvenega področja biotehnologija na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani.

Doktorska disertacija je bila opravljena na Oddelku za poljedelstvo, vrtnarstvo, genetiko in žlahtnjenje Kmetijskega inštituta Slovenije, na Odseku za biotehnologijo Inštituta »Jožef Stefan« ter na Katedri za aplikativno botaniko, ekologijo, fiziologijo rastlin in informatiko Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Na podlagi statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepu Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 23. 9. 2014 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje biotehnologija. Za mentorja je bil imenovan izr. prof. dr. Vladimir Meglič.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: izr. prof. dr. Jernej JAKŠE
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: izr. prof. dr. Jelka ŠUŠTAR-VOZLIČ
Kmetijski inštitut Slovenije

Član: red. prof. dr. Dominik VODNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora: 18. maj 2017

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

Mateja ZUPIN

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	UDK 635.562: 601.4: 575.116.4: 631.524.85.01 (043.3)
KG	<i>Phaseolus vulgaris</i> /sušni stres/DNA marker/kartiranje QTL
AV	ZUPIN, Mateja univ. dipl. inž. agr.
SA	MEGLIČ Vladimir (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študijski program Bioznanosti, znanstveno področje biotehnologija
LI	2017
IN	ODZIV NAVADNEGA FIŽOLA (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) NA SUŠNI STRES: KVANTITATIVNO KARTIRANJE LOKUSOV
TD	Doktorska disertacija
OP	XIV, 142, [69] str., 23 pregl., 23 sl., 17 pril., 293 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Suša je eden izmed najpomembnejših abiotskih stresnih dejavnikov, ki zmanjšuje pridelek zrnatih stročnic, kot je navadni fižol. Ta je pomemben v prehrani ljudi zaradi visoke vsebnosti beljakovin in esencialnih hranil. Razvoj sort z močno toleranco na sušni stres je glavni cilj številnih programov žlahtnjenja fižola v svetu. Cilj te raziskave je bil ovrednotiti sorti navadnega fižola z različno toleranco na sušo in njune potomce, rekombinantne inbridirane linije (RIL) F₈-generacije, z različnimi parametri in določiti lokuse kvantitativnih lastnosti (QTL) povezanih z odzivom rastline na sušni stres. Na sušo bolj tolerantno sorto 'Tiber' in manj tolerantno sorto 'Starozagorski črn' smo ovrednotili z različnimi morfološki ter fiziološkimi parametri, s količino pridelka, molekulskimi markerji in z analizo izražanja štirih genov, ki kodirajo akvaporine, ter dveh genov, ki kodirajo proteaze. Poskuse smo izvedli v rastni komori in rastlinjaku, v kontroliranih razmerah. Enaindvajseti dan rasti smo starševski liniji in potomce prenehali zalivati ter jih tako izpostavili suši. Meritve in vzorčenja smo opravili dan pred sušo, v treh časovnih stopnjah suše ter po rehidraciji: glede na vsebnost vode v substratu in vodni potencial rastlin. Rastline RIL smo vrednotili s parametri, ki so razlikovali starševski liniji. S skupno 105 polimorfnimi markerji (SSR, AFLP in morfološki) smo izdelali 486,27 cM dolgo vezano gensko karto navadnega fižola. Markerje smo razporedili v 10 vezanih skupin (LG). V analizo QTL smo poleg genske karte vključili 28 kvantitativnih lastnosti, s katerimi smo določili 18 QTL. Regije QTL so povezane z lastnostmi: št. dni do cvetenja, št. dni do pojava strokov, št. strokov na rastlino, št. semen na strok, masa 100 semen s fiziološkimi lastnostmi, povezanimi z odzivom rastline na sušo, ki do sedaj še niso bile kartirane: vodni potencial in hitrost transporta elektronov. Določili smo jih na LG1, LG2, LG5, LG6 in LG9. Identificirane QTL, ki so odgovorne za toleranco na sušo, in drugi markerji bodo pomembno prispevali k procesu žlahtnjenja, k razvoju orodij za pridobivanje novih sort z izboljšano toleranco na različne dejavnike stresa. S tem bo tveganje za izgubo količine in kakovosti pridelka, tako navadnega fižola kot tudi drugih kmetijsko pomembnih poljščin, manjše.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 635.562: 601.4: 575.116.4: 631.524.85.01 (043.3)
CX *Phaseolus vulgaris*/drought stress/DNA marker/QTL mapping
AU ZUPIN, Mateja
AA MEGLIČ Vladimir (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biosciences, Scientific Field Biotechnology
PY 2017
TI RESPONSE TO DROUGHT STRESS IN COMMON BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.): QTL MAPPING
DT Doctoral Dissertation
NO XIV, 142, [69] p., 23 tab., 23 fig., 17 ann., 293 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Drought is one of the most important abiotic stress factors limiting the yield of major seed legumes such as common bean, which is important in human diet, due to its high protein content and essential nutrients. The development of cultivars with strong tolerance to drought stress is the main goal of many breeding programs of common bean in the world. The aim of this study was to evaluate two common bean cultivars with different tolerance to drought and their progeny, F₈ generation recombinant inbred lines (RILs), with parameters on different levels and to determine the quantitative traits loci (QTL) associated with the response of plants to drought stress. We characterized more tolerant cultivar 'Tiber' and less tolerant cultivar 'Starozagorski čern' with different morphological and physiological parameters, crop yield, and molecular markers. Parental lines were evaluated for differences in expression level of four aquaporin genes and two protease genes. The experiments were performed in a growth chamber and greenhouse under controlled conditions. The day before flowering, we withdrew irrigation of the mapping population to expose them to drought. Measurements and samplings were performed the day before drought, at three time points of drought and after rehydration. RILs were characterized with parameters, which distinguished the parental lines. With a total of 105 polymorphic microsatellites, AFLP and morphological markers, we developed a genetic map of common bean. Markers were assigned to 10 linkage groups (LGs). The QTL analysis included 28 quantitative traits with which we have determined 18 QTLs. QTLs were associated with days to flowering, days until pods, pods per plant, seed per pod, 100 seed mass and physiological traits associated with drought, namely water potential and electron transport rate. We have linked them to LG1, LG2, LG5, LG6 and LG9. Mapped QTL regions, which are responsible for tolerance to drought and other markers, will significantly contribute to the process of breeding. They would contribute to the development of tools for the production of new cultivars with improved tolerance to different stress factors and thus reduce the risk of loss of the quantity and quality of common bean and could be applied as well to other important agricultural crops.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	X
KAZALO PRILOG.....	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XIII
1 UVOD.....	1
1.1 CILJI IN HIPOTEZE DOKTORSKE DISERTACIJE.....	3
2 PREGLED OBJAV.....	4
2.1 NAVADNI FIŽOL (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	4
2.1.1 Izvor in domestikacija.....	4
2.1.2 Osnovne lastnosti.....	6
2.1.3 Žlahtnjenje.....	7
2.2 ODZIV RASTLIN NA SUŠNI STRES.....	10
2.2.1 Sušni stres.....	10
2.2.2 Morfološki in fenološki odziv rastlin na sušo.....	11
2.2.3 Fiziološki odziv rastlin na sušo.....	12
2.2.4 Molekulski markerji in njihova uporabnost pri študijah sušnega stresa....	14
2.2.5 Odziv rastlin na sušo na biokemijskem nivoju.....	15
2.3 GENSKO KARTIRANJE.....	18
2.3.1 Rekombinacije in povezanost genov.....	20
2.3.2 Izbira populacije za kartiranje.....	21
2.3.3 Izdelava vezane genske karte.....	24
2.3.3.1 Analiza polimorfnih markerjev.....	24
2.3.3.2 Segregacijski odklon.....	24
2.3.3.3 Tvorba vezanih skupin.....	25
2.3.3.4 Funkcije genskega kartiranja.....	26
2.3.3.5 Računalniški programi za gensko kartiranje.....	27
2.4 ANALIZA QTL.....	28
2.4.1 Statistične metode analize QTL.....	29
2.4.1.1 Vezanost posameznega markerja s QTL.....	29
2.4.1.2 Intervalno kartiranje.....	29
2.4.1.3 Kompozitno intervalno kartiranje.....	30

2.4.1.4	Računalniški programi za kartiranje QTL	30
2.5	ALTERNATIVNE METODE QTL-KARTIRANJA	30
3	MATERIAL IN METODE	32
3.1	RASTLINSKI MATERIAL	32
3.2	PRIPRAVA RASTLINSKEGA MATERIALA ZA VREDNOTENJE	33
3.2.1	Vzgoja rastlin starševskih linij	33
3.2.2	Vzgoja rastlin rekombinantnih inbridiranih linij	36
3.3	METODE	38
3.3.1	Merjenje vsebnosti vode v substratu	38
3.3.2	Meritve fizioloških parametrov	38
3.3.2.1	Relativna vsebnost vode v listih	38
3.3.2.2	Vodni potencial	38
3.3.2.3	Fluorescenca klorofila	39
3.3.2.4	Meritev netofotosinteze, prevodnosti listnih rež in transpiracije	40
3.3.3	Vrednotenje morfoloških in fenoloških lastnosti ter velikosti pridelka	40
3.3.4	Analiza z molekulskimi markerji	41
3.3.4.1	Izolacija in kvantifikacija DNA	41
3.3.4.2	Izolacija in kvantifikacija RNA	42
3.3.4.3	Mikrosatelitni markerji	43
3.3.4.4	Markerji AFLP	45
3.3.4.5	Markerji SRAP	48
3.3.4.6	Markerji RGAP	49
3.3.4.7	Markerji SRAP-RGA	50
3.3.4.8	Markerji RAPD	51
3.3.4.9	Markerji ISSR in delno specifični markerji	51
3.3.4.10	Analiza vpliva suše na izražanje genov, ki kodirajo akvaporine, pri starševskih linijah	53
3.3.4.11	Analiza vpliva suše na izražanje genov, ki kodirajo proteaze, pri starševskih linijah	59
3.3.4.12	Ločevanje pomnoženih fragmentov DNA	60
3.4	STATISTIČNA ANALIZA	61
3.5	GENSKO KARTIRANJE IN ANALIZA QTL	62
3.5.1	Analiza vezanosti markerjev (gensko kartiranje)	62
3.5.2	Analiza QTL	64
4	REZULTATI	65
4.1	KARAKTERIZACIJA RASTLIN STARŠEVSKIH LINIJ	65
4.1.1	Vrednotenje morfoloških, fenoloških lastnosti in pridelka	65

4.1.2	Vrednotenje fizioloških lastnosti	66
4.1.3	Vrednotenje polimorfizmov molekulskih markerjev	73
4.1.4	Vpliv sušnega stresa na izražanje genov, ki kodirajo akvaporine.....	73
4.1.4.1	Identifikacija sekvenc DNA podobnih znanim genom za akvaporine	73
4.1.4.2	Vpliv suše na izražanje genov <i>PvPIP1;2</i> , <i>PvPIP2;7</i> , <i>PvTIP1;1</i> , <i>PvTIP4;1</i> ..	78
4.1.5	Vpliv sušnega stresa na izražanje genov proteaz <i>PvSLP1</i> in <i>PvSLP2</i>	82
4.2	KARAKTERIZACIJA RASTLIN REKOMBINANTNIH INBRIDIRANIH LINIJ	84
4.2.1	Vrednotenje morfoloških, fenoloških lastnosti in pridelka	84
4.2.2	Vrednotenje fizioloških lastnosti	90
4.2.3	Analiza z molekulskimi markerji	91
4.3	GENSKO KARTIRANJE IN ANALIZA QTL	92
4.3.1	Izdelava vezane genske karte	92
4.3.2	Analiza QTL	93
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	100
5.1	RAZPRAVA	100
5.1.1	Vrednotenje lastnosti populacije za kartiranje.....	100
5.1.1.1	Vrednotenje z morfološkimi in fenološkimi parametri ter količino pridelka.....	101
5.1.1.2	Vrednotenje s fiziološkimi parametri.....	103
5.1.1.3	Analiza z molekulskimi markerji	104
5.1.1.4	Analiza izražanja genov akvaporinov in proteaz pri starševskih linijah Napaka! Zaznamek ni definiran.	
5.1.2	Kartiranje molekulskih markerjev	108
5.1.3	Kartiranje lokusov kvantitativnih lastnosti.....	110
5.2	SKLEPI	113
6	POVZETEK (SUMMARY)	114
6.1	POVZETEK	114
6.2	SUMMARY	117
7	VIRI.....	119
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Plan meritev in vzorčenja rastlin navadnega fižola za karakterizacijo sorte 'Tiber' in sorte 'Starozagorski črn' v poskusih v rastni komori na Inštitutu »Jožef Stefan« ter v rastlinjaku na Biotehniški fakulteti v Ljubljani.	36
Preglednica 2: Plan meritev in vzorčenja rastlin RIL navadnega fižola v dveh poskusih v rastlinjaku na Biotehniški fakulteti in Kmetijskem inštitutu Slovenije.	37
Preglednica 3: Seznam 19 proučevanih morfoloških znakov rastlin sorte 'Tiber', sorte 'Starozagorski črn' in 82 rekombinantnih inbridiranih linij.	41
Preglednica 4: Seznam in nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov ter adapterjev, uporabljenih v analizi AFLP.	46
Preglednica 5: Seznam začetnih oligonukleotidov markerjev SRAP in njihove sekvence.	48
Preglednica 6: Seznam začetnih oligonukleotidov markerjev RGAP in njihove sekvence.	49
Preglednica 7: Seznam začetnih oligonukleotidov markerjev RAPD in njihove sekvence.	51
Preglednica 8: Seznam začetnih oligonukleotidov ISSR in delno specifičnih markerjev ter njihove sekvence.	52
Preglednica 9: Seznam degeneriranih začetnih oligonukleotidov s sekvencami, pozicijo in degeneriranostjo.	53
Preglednica 10: Seznam dolžin produktov fragmentov DNA in njihovih koncentracij, ki smo jih dobili z različnimi kombinacijami PIP in TIP začetnih oligonukleotidov.	55
Preglednica 11: Referenčna gena (<i>IDE</i> , <i>Ukn2</i>) in štirje geni akvaporinov (<i>PvPIP1;2</i> , <i>PvPIP2;7</i> , <i>PvTIP1;1</i> , <i>PvTIP4;1</i>) s sekvencami začetnih oligonukleotidov ter sekvencami MGB-sond.	58
Preglednica 12: Sekvence homolognih začetnih oligonukleotidov in sond dveh genov subtilaz (<i>PvSLP1</i> , <i>PvSLP2</i>) ter treh referenčnih genov (<i>EF1</i> , <i>Cyp</i> , <i>GAPC2</i>).	60
Preglednica 13: Morfološke in fenološke lastnosti ter količina pridelka navadnega fižola sorte 'Tiber' in 'Starozagorski črn'.	65
Preglednica 14: Število testiranih molekulskih markerjev in delež polimorfni kombinacij.	73
Preglednica 15: Seznam sekvenc podobnih akvaporinskim genom s pozicijo začetnih oligonukleotidov in oceno dolžine produkta fragmenta DNA.	74
Preglednica 16: Prisotnost motiva NPA in ar/R-selektivnega sita v fižolovih aminokislinskih sekvencah podobnih akvaporinom.	76
Preglednica 17: Rezultati dvosmerne ANOVA (sorta × stopnja suše) relativne stopnje izražanja genov akvaporinov v vzorcih sorte 'Tiber' in 'Starozagorski črn' v 5., 9. in 11 dnevu suše ter v rehidraciji iz poskusa IJS 1.	80
Preglednica 18: Frekvenčna porazdelitev kategoriziranih morfoloških znakov 80 RIL navadnega fižola.	84

Preglednica 19: Osnovna statistika numeričnih fenoloških znakov in količine pridelka, pridobljenega na vzorcih 80 RIL navadnega fižola.	85
Preglednica 20: Ocena povezanosti morfoloških znakov, pridobljena s Pearsonovim korelacijskim koeficientom.....	86
Preglednica 21: Fisher-jev test najmanjših značilnih razlik med povprečji različnih lastnosti dveh homolognih skupin RIL na podlagi barve semen, s podatki poskusa na BF (A) in KIS (B).	88
Preglednica 22: Prikaz števila markerjev AFLP, mikrosatelitov (SSR) in morfoloških markerjev po vezanih skupinah (LG), dolžine posamezne vezane skupine ter povprečne razdalje med markerji po vezanih skupinah genske karte navadnega fižola.	92
Preglednica 23: QTL petih kvantitativnih lastnosti rastlin RIL, potomcev sorte 'Tiber' × 'Starozagorski črn' pred sušo (K) in v dveh časovnih stopnjah suše (S1, S2): iz poskusov na BF in KIS.	96

KAZALO SLIK

Slika 1: Odziv rastline na sušni stres.....	11
Slika 2: Potek pridobivanja glavnih tipov populacij za kartiranje samoprašnih vrst rastlin.	23
Slika 3: Postopek pridobitve populacije 82 rekombinantnih inbridiranih linij F ₈ -generacije za kartiranje lokusov kvantitativnih lastnosti.....	32
Slika 4: Shema karakterizacije populacije za kartiranje QTL.....	33
Slika 5: Poskus karakterizacije navadnega fižola sorte 'Tiber' in sorte 'Starozagorski črn' v rastni komori na Inštitutu »Jožef Stefan« v času pred cvetenjem.	34
Slika 6: Načrt meritev in vzorčenja tretjih popolnoma razvitih sestavljenih listov rastlin navadnega fižola sorte 'Tiber' in 'Starozagorski črn'.	35
Slika 7: Poskus karakterizacije 82 rekombinantnih inbridiranih linij F ₈ -generacije v rastlinjaku na BF (A) in KIS (B).	37
Slika 8: Princip delovanja Scholanderjeve tlačne komore.	39
Slika 9: Parametri fluorescence klorofila pri temotno in svetlobno adaptiranem listu.	40
Slika 10: Odziv rastlin navadnega fižola sorte 'Tiber' in 'Starozagorski črn' v suši 1 (a) in v suši 2 (b).	67
Slika 11: Prikaz vsebnosti vode v substratu in rastlinah sorte 'Tiber' ter 'Starozagorski črn' pred sušo, v treh časovnih stopnjah suše in v rehidraciji.	69
Slika 12: Prikaz relativne vsebnosti vode v listih (RVV) (a) in vodnega potenciala (VP) (b) v odvisnosti od vsebnosti vode v substratu (VVS) ter korelacija med RVV in VP (c) vseh merjenih rastlin v suši sorte 'Tiber' in 'Starozagorski črn' dan pred sušo ter v treh časovnih stopnjah suše.	71
Slika 13: Prikaz fizioloških parametrov rastlin, izpostavljenih suši, in kontrolnih rastlin sorte 'Tiber' ter 'Starozagorski črn' pred sušo, v dveh ali treh časovnih stopnjah suše in v rehidraciji.....	72
Slika 14: Filogenetsko drevo fižolovih aminokislinskih sekvenc podobnih akvaporinom in aminokislinskih sekvenc že znanih akvaporinov drugih rastlinskih vrst.	75
Slika 15: Poravnava fižolovih aminokislinskih sekvenc podobnih akvaporinom z že znanimi sekvencami akvaporinov drugih rastlinskih vrst.	78
Slika 16: Vizualizacija produktov PCR štirih akvaporinskih genov (<i>PvPIP1;2</i> , <i>PvPIP2;7</i> , <i>PvTIP1;1</i> , <i>PvTIP4;1</i>) in dveh referenčnih genov (<i>IDE</i> , <i>Ukn2</i>) pri kontrolnih rastlinah sorte 'Tiber' (T) in 'Starozagorski črn' (S) na 1,4% agaroznem gelu.	78
Slika 17: Filogenetsko drevo fižolovih sekvenc DNA, ki kodirajo akvaporine, in sekvenc, ki so njim podobne.....	79
Slika 18: Relativna stopnja izražanja ($2^{-\Delta\Delta CT}$) genov <i>PvPIP1;2</i> , <i>PvPIP2;7</i> , <i>PvTIP1;1</i> in <i>PvTIP4;1</i> pri sorti 'Tiber' ter sorti 'Starozagorski črn' iz poskusa IJS 1.....	81

Slika 19: Relativna stopnja izražanja ($2^{-\Delta\Delta CT}$) genov <i>PvSLP1</i> in <i>PvSLP2</i> pri kontrolnih rastlinah (K) in v vzorcih rastlin, izpostavljenih suši (10., 24., 38. dan), glede na stopnjo izražanja pri kontrolnih rastlinah sorte 'Tiber'	83
Slika 20: Razvrstitev rastlin RIL s poskusa BF glede na morfološke parametre, s pomočjo metod PCA (a) in LDA (b).	89
Slika 21: Razvrstitev rastlin RIL s poskusa KIS glede na morfološke parametre, s pomočjo metod PCA (a) in LDA (b).	90
Slika 22: Vezana genska karta populacije RIL, potomcev križanja sorte 'Tiber' × 'Starozagorski'	93
Slika 23: Graf prikazuje povezanost 28 kvantitativnih lastnosti z molekulskimi markerji na 10 vezanih skupinah.....	95

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Fenotipske različice nekaterih proučevanih morfoloških znakov (Singh, 1991: 382)
- Priloga B: Seznam in nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov mikrosatelitnih markerjev
- Priloga C: Seznam do sedaj znanih in potencialnih akvaporinov navadnega fižola
- Priloga D: Podatki fenoloških in fizioloških parametrov ter vrednotenja pridelka RIL navadnega fižola
- Priloga E: Rezultati fizioloških lastnosti sorte 'Tiber' in sorte 'Starozagorski črn', merjeni pred sušo, v treh časovnih stopnjah suše in rehidraciji v poskusu IJS2
- Priloga F: Vsebnost vode v substratu (VVS), relativna vsebnost vode v listih (RVV) in vodni potencial (VP) rastlin navadnega fižola sorte 'Tiber' ter 'Starozagorski črn' dan pred sušo (0. dan), med sušo (3.–11. dan) in v rehidraciji (11R)
- Priloga G: Relativna vsebnost vode v listih (RVV) (a) in vodni potencial (VP) (b) rastlin, izpostavljenih suši (S), ter kontrolnih rastlin (K) navadnega fižola sorte 'Tiber' (TB) in 'Starozagorski črn' (SČ) v štirih časovnih stopnjah suše (4., 10., 24. in 38. dan) in v rehidraciji (RE) iz poskusa BF_{SL}
- Priloga H: Vpliv relativne vsebnosti vode (RVV) v listih in vodnega potenciala (VP) na prevodnost listnih rež (g_s) ter povezava med g_s in netofotosintezo (A_N)
- Priloga I: Seznam testiranih in polimorfnih kombinacij uporabljenih markerjev
- Priloga J: Seznam kombinacij začetnih oligonukleotidov akvaporinom podobnih sekvenc in njim najbolj podobnih že znanih sekvenc akvaporinov
- Priloga K: Rezultati fizioloških parametrov RIL navadnega fižola, merjeni v treh časovnih stopnjah, iz poskusov na BF in KIS
- Priloga L: Vpliv suše na vodni potencial, merjen v treh časovnih stopnjah sušnega stresa pri 82 RIL navadnega fižola, iz poskusov na BF in KIS
- Priloga M: Vpliv suše na potencialno fotokemično učinkovitost, merjeno v treh časovnih stopnjah sušnega stresa pri 82 RIL navadnega fižola, iz poskusov na BF in KIS.
- Priloga N: Vpliv suše na hitrost transporta elektronov, merjeno v treh časovnih stopnjah sušnega stresa pri 82 RIL navadnega fižola, iz poskusov na BF in KIS
- Priloga O: Segregacijski test markerjev za vezano kartiranje
- Priloga P1: Osnovni vremenski podatki za agrometeorološko postajo Drenov grič za obdobje 17. 6.–12. 7. 2013
- Priloga P2: Osnovni vremenski podatki za agrometeorološko postajo KIS2 za obdobje 28. 5.–13. 6. 2014
- Priloga P3: Osnovni podatki vremenskih razmer v obdobju april–september v letih 2013 in 2014 v primerjavi z dolgoletnim povprečjem 1961–1990 za Ljubljano Bežigrad
- Priloga R: Genska karta Galeano-Fernandez, 2011

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AFLP	pomnoženi fragmenti dolžinskih polimorfizmov (angl. amplified fragment length polymorphism)
AKP	akvaporini
ar/R	aromatično/arginin selektivno sito
bp	bazni par
cDNA	komplementarna DNA (angl. copy DNA)
CIM	kompozitno intervalno kartiranje (angl. composite interval mapping)
cM	centiMorgan
Cyp	citokrom P450
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksi nukleotid trifosfat
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina – dinatrijeva sol
EF1	elongacijski faktor 1
FAM	5-karboksifluorescein
GAPC2	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze
HEX	6-heksakloro-karboksi-fluorescein
ISSR	med enostavnimi sekvenčnimi ponovitvami pomnožene regije (angl. inter simple sequence repeat)
LG	vezana skupina (angl. linkage group)
MAS	selekcija s pomočjo markerjev (angl. marker assisted selection)
MGB-probe	vezava sonde na manjšo brazdo DNA (angl. minor groove binding)
MIM	multiplno intervalno kartiranje (angl. multiple interval mapping)
NPA	asparagin-prolin-alanin
PEG	polietilenglikol
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
PvSLP1	<i>Phaseolus vulgaris</i> , subtilizinu podobna proteaza 1
PvSLP2	<i>Phaseolus vulgaris</i> , subtilizinu podobna proteaza 2
QTL	lokusi kvantitativnih lastnosti (angl. quantitative trait loci)
R ²	koeficient determinacije
RAPD	naključno pomnoženi DNA-polimorfizmi (angl. random amplified polymorphic DNA)
RFLP	dolžinski polimorfizmi restrikcijskih fragmentov (angl. restriction fragment length polymorphism)

RGAP	odporni geni analognih polimorfizmov (angl. resistance gene analog polymorphism)
RIL	rekombinantne inbridirane linije
RNA	ribonukleinska kislina
RT-qPCR	kvantitativni PCR v realnem času, s predhodnim obratnim prepisovanjem
RVV	relativna vsebnost vode
SIM	enostavno intervalno kartiranje (angl. simple interval mapping)
SMA	analiza posameznega markerja (angl. single-marker analysis)
SNP	polimorfizem posameznih nukleotidov (angl. single nucleotide polymorphism)
SRAP	sekvencam podobni pomnoženi polimorfizmi (angl. sequence-related amplified polymorphism)
SSD	selekcija potomstva posamičnega semena (angl. single seed descent)
SSR	enostavne sekvenčne ponovitve ali mikrosateliti (angl. simple sequence repeats or microsatellites)
Ta	temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov (angl. annealing temperature)
TAMRA	6-karboksi-tetrametil-rodamin
VP	vodni potencial
VVS	vsebnost vode v substratu

1 UVOD

Navadni fižol (*Phaseolus vulgaris* L.) pridelujejo v svetu na dobrih 24 milijonih hektarov, kar predstavlja tretjino celotne pridelave stročnic (FAOSTAT, 2014). Največ ga pridelajo v Braziliji, ZDA in Mehiki, med celinami pa vodi Afrika (4 milijone ton). V Evropi se ga največ prideluje v balkanskih državah ter mediteranskem delu Italije in Španije. Tudi v Sloveniji ima pridelava fižola večstoletno tradicijo. Skozi stoletja kontinuirane pridelave so se ob različnih klimatskih in talnih razmerah, veliki pestrosti krajine, izoliranosti ter zaradi različnega načina pridelave in uporabe v Sloveniji razvile številne avtohtone populacije in sorte fižola (Šuštar-Vozlič in sod., 2000). V prehrani ljudi je navadni fižol nepogrešljiv zaradi velike vsebnosti beljakovin in ogljikovih hidratov, vsebuje pa tudi pomembne vitamine in minerale, kot so železo, magnezij, kalij, cink, selen in kalcij (Broughton in sod., 2003; Blair in sod., 2009, 2016). Zaradi visoke hranilne vrednosti in velikega odstotka beljakovin predstavlja predvsem v revnejših državah glavni vir esencialnih hranil in služi tudi kot nadomestek mesu (de Almeida Costa in sod., 2006).

Na splošno navadni fižol v času rasti zahteva veliko količino vode, zato je znan po nizki toleranci na sušni stres (Broughton in sod., 2003). To pomeni, da ima pomanjkanje vode lahko velik vpliv na rast, razvoj in pridelek. Suša se lahko stopnjuje skozi celotno rastno dobo rastline, lahko pa se pojavi v določenem razvojnem stadiju in vpliva na zgodnji razvoj rastline, vegetativno rast, cvetenje ter zorenje strokov (Rao, 2001). Čas pojava, intenziteta ter dolžina trajanja sušnega stresa lahko pomembno vplivajo na količino in kakovost pridelka. Ocenjeno je, da suša vsako leto povzroči 60% izgubo pridelka (Beebe in sod., 2012; White in Singh, 1991), ob močni suši pa je izguba lahko tudi do 80% (Rao, 2001).

Odziv na sušni stres je vrstno specifičen in pogosto tudi odvisen od genotipa (De Leonardis in sod., 2012). Rastline se na sušo lahko odzovejo s strategijo izogiba, tako da niso izpostavljene dehidraciji (npr. hitro zaključen fenološki razvoj, listopadnost), ali pa se z njo soočijo, pri čemer uporabljajo različne morfološko-anatomske prilagoditve in fiziološke oz. presnovne mehanizme, ki pripomorejo k večji ali manjši toleranci (Beebe in sod., 2013). Toleranca na sušo je zapletena, poligenska lastnost, povezana z odzivi na različnih nivojih, odraža se na ravni celic in rastlinskih organov (Shinozaki in Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Shao in sod., 2008). Tolerantne rastline dopuščajo zelo nizek vodni potencial in padec turgorja ali pa ohranjajo kolikor toliko ugoden turgor (npr. z osmotsko prilagoditvijo, elastičnostjo celičnih sten) in ne dovolijo, da bi ta komponenta vodnega potenciala preveč padla. Za toleranco na sušni stres so ključne spremembe v presnovi, *de novo* sintezi zaščitnih proteinov (dehidrini, šaperoni) in razgradnja nepopravljivo poškodovanih proteinov s pomočjo proteaz (Vaseva in sod., 2011).

Raziskave na več rastlinskih vrst, med njimi tudi na stročnicah, so pokazale, da suša vpliva na proteaze na različnih ravneh, od izražanja genov, ki jih kodirajo, do njihove aktivnosti (Vaseva in sod., 2012; Budič in sod., 2013). Ob močnem sušnem stresu je odgovor na nivoju proteazne aktivnosti močno povezan z občutljivostjo posameznega genotipa na sušo (Roy-Macauley in sod., 1992; Cruz de Carvalho in sod., 2001; Hieng in sod., 2004; Dramé in sod., 2007).

Medtem ko nam fiziološke meritve, anatomske in osnovne biokemijske analize rastlin omogočajo boljše razumevanje kompleksnega prepleta s sušo povezanih lastnosti, nam molekularna biologija in genovski pristop omogočata identifikacijo kandidatnih genov in kvantitativnih lokusov, povezanih s temi lastnostmi (Mir in sod., 2012). Zahvaljujoč velikemu napredku na področju molekularne genetike, so za glavne rastlinske vrste razvita obsežna genomska orodja. Za večino vrst imamo na voljo že veliko število molekulskih markerjev, ki so nam v pomoč pri selekciji in kartiranju kvantitativnih lastnosti (angl. QTL mapping).

Prva genska karta navadnega fižola je bila razvita z uporabo molekulskih markerjev na podlagi dolžinskih polimorfizmov restrikcijskih fragmentov – RFLP (angl. restriction fragment length polymorphism) (Adam-Blondon in sod., 1994; Nodari in sod., 1993; Vallejos in sod., 1992), kasneje pa je število genskih kart naraslo predvsem z uporabo naključno pomnoženih polimorfni markerjev DNA – RAPD (angl. random amplified polymorphic DNA) (Freyre in sod., 1998), mikrosatelitov oz. markerjev SSR (angl. microsatellite oz. simple sequence repeats) (Blair in sod., 2003; Grisi in sod., 2007; Yu in sod., 2000) ter dolžinskih polimorfizmov namnoženih restrikcijskih fragmentov – AFLP (angl. amplified fragment length polymorphism) (Hanai in sod., 2010). Za navadni fižol je bilo narejenih več kot 25 različnih genskih kart. Večina temelji na križanju staršev iz dveh različnih genskih skladov, andskega in srednjeameriškega (Singh in sod., 1991). Genskih kart populacije križancev istega genskega sklada, predvsem andskega, ni veliko narejenih (Blair in sod., 2012; McClean in sod., 2012).

Pri fižolu je v primerjavi z odpornostjo na bolezni in škodljivce toleranca na abiotske dejavnike veliko manj raziskana. Razvoj sušnim razmeram prilagojenih sort fižola je pomemben korak k zmanjšanju izgub pridelka in izboljšanju prehranske varnosti – kot odgovor na klimatske spremembe (Beebe in sod., 2012).

Določitev kandidatnih genskih regij in analiza vezanosti s kvantitativnimi lastnostmi povezanimi s sušo (analiza QTL) bo pripomoglo k večjem razumevanju odziva rastlin na sušni stres. Rezultati raziskave bodo velik doprinos žlahtnjenju sort navadnega fižola tolerantnih na sušo.

1.1 CILJI IN HIPOTEZE DOKTORSKE DISERTACIJE

Cilji

- Določiti razlike v odzivu na sušni stres med dvema na sušo različno tolerantnima sortama navadnega fižola: 'Tiber', 'Starozagorski črn'.
- Okarakterizirati potomce križancev (RIL) izbranih starševskih linij ('Tiber', 'Starozagorski črn') z različnimi morfološkimi in fiziološkimi lastnostmi, ki so povezane z odzivom na sušni stres in razlikujejo ti dve starševski liniji.
- Zbrati dovolj polimorfnih markerjev za izdelavo genske karte navadnega fižola
- Na genski karti določiti mesta kvantitativnih lastnosti (QTL) povezana z odzivom na sušni stres, ki bodo pripomogla k natančnejši selekciji sort navadnega fižola tolerantnih na sušo.

Hipoteze

- S spremljanjem in merjenjem morfoloških in fizioloških parametrov ter analizami odziva proteaz bomo opredelili lastnosti, ki se v suši razlikujejo med na sušo različno tolerantnima starševskima linijama navadnega fižola ('Tiber', 'Starozagorski črn').
- S karakterizacijo starševskih linij navadnega fižola ('Tiber', 'Starozagorski črn') in njunih potomcev (RIL) F₈-generacije, izpostavljenih sušnemu stresu, bomo pridobili podatke o segregirajočih morfoloških in fizioloških lastnostih, ki bodo podlaga za analizo QTL.
- S karakterizacijo starševskih linij in rastlin RIL bomo z različnimi molekulskimi markerji pridobili zadostno število polimorfizmov, na osnovi katerih bomo izdelali gensko karto navadnega fižola
- Z analizo QTL bomo identificirali markerje, ki bodo v tesni povezanosti z lokusi, udeleženi v odziv navadnega fižola na sušni stres.

2 PREGLED OBJAV

2.1 NAVADNI FIŽOL (*Phaseolus vulgaris* L.)

2.1.1 Izvor in domestikacija

Navadni fižol je najpomembnejša zrnata stročnica za prehrano ljudi na svetu (CGIAR, 2017). Raznolikost v načinu rasti, lastnosti semena in času zrelosti je pri navadnem fižolu največja v primerjavi z drugimi kmetijsko najpomembnejšimi rastlinami. Variabilnost omogoča široko območje pridelovanja v različnih podnebnih razmerah. Navadni fižol pridelujejo v Ameriki, Afriki, na srednjem vzhodu, Kitajskem in v Evropi (Blair in sod., 2010). V državah v razvoju, kot so osrednja in Južna Amerika ter jugozahodna Afrika, predstavlja glavni vir proteinov, zato je kritična komponenta boja proti podhranjenosti na sto tisoče malih kmetov (FAOSTAT, 2014). Prideluje se ga zaradi listov, strokov, nezrelih in zrelih zrn. Poleg velike nutritivne vrednosti se zrnje navadnega fižola lahko dolgo shranjuje, ne potrebuje veliko prostora in se ga preprosto pripravi kot jed. Suhi listi, stroki in stebela so pomemben vir hranil za živali ter uporabni za gorivo, predvsem v Afriki in Aziji (CGIAR, 2016). Je pomembna komponenta v kolobarju, saj zmanjšuje uporabo pesticidov, razvoj bolezni in plevelov, povečuje kakovost prsti in biotsko raznolikost, omogoča biološko fiksacijo dušika in pomaga pri pozitivnem okoljskem vplivu zaradi zmanjšanja emisij toplogrednih plinov (Nemecek in sod., 2008; Peoples in sod., 2009a, 2009b).

Navadni fižol izhaja iz Mehike (Bitocchi in sod., 2012), od koder se je razširil v Južno Ameriko. Razvila sta se zelo ekogeografsko različna genska sklada, srednjeameriški in andski (Gepts, 1998). Srednjeameriški divji fižol, v primerjavi z andskim cveti kasneje in dlje, ima daljše peclje socvetij, večje cvetne brakteole in manjša semena (Gepts in sod., 1986). Domestikacija se je začela takoj po nastanku teh dveh skladov in se je razvila v neodvisna domestikacijska dogodka, za vsak genski sklad, kar dokazujejo različne študije delitve genskih virov navadnega fižola na podlagi različnih markerjev (Acosta-Gallegos in sod., 2007; Angioi in sod., 2009; McConnell in sod., 2010; Bitocchi in sod., 2012; Maras in sod., 2013). V srednjeameriški genski sklad sodi predvsem fižol iz Kolumbije, Venezuele, osrednje Amerike in Mehike, medtem ko andski genski sklad združuje genske vire iz Peruja, Bolivije in Argentine. Rezultati Bitocchi in sod. (2013) so pokazali, da je domestikacija v srednjeameriškem genskem skladu povzročila močno redukcijo genske raznolikosti, kar potrjujejo obsežne študije s pomočjo morfoloških (Gepts in Debouck, 1991), proteinskih in aloencimskih molekulskih markerjev (Bercerra-Velasquez in Gepts, 1994; Tohme in sod., 1996; Kwak in Gepts, 2009; Rossi in sod., 2009; Zargar in sod., 2015) in z uporabo tehnologij sekveniranja RNA ter analizo transkriptoma (Bellucci in sod., 2014).

Po odkritju Amerike se je fižol v 16. stoletju razširil na ostale kontinente. Danes je prisoten na vseh celinah, razen Antarktike in zavzema več kot 90 % pridelovalnih območij rodu *Phaseolus* na svetu (Singh, 1999). Med državami poleg Mehike (1,27 Mt) in ZDA (1,31 Mt) največ fižola pridelata Brazilija, kar 3,3 milijone ton leta 2014. Afrika je s 4 milijoni ton druga največja regija, kjer pridelujejo fižol (FAOSTAT, 2014). Velikokrat se v podatke o pridelovalnih površinah in količini pridelka fižola oz. angl. 'dry bean' vključuje tudi

podatke držav, kot so Indija, Mjanmar in Kitajska, kjer se v količini 1–4,7 Mt prideluje predvsem fižol mungo in adzuki, ki pa sodita v rod *Vigna* in ne *Phaseolus*.

V Evropo je prvi fižol prišel okrog leta 1500 (Zeven, 1997), najverjetneje iz srednjeameriškega centra variabilnosti (Rodino in Drevon, 2004). Na osnovi raziskav posameznih zbirk fižola so z biokemičnimi in molekulskimi markerji ugotovili, da je večina evropske dednine fižola danes andskega izvora (Gepts in Bliss, 1988; Šuštar-Vozlič in sod., 2006). Andski genotipi so se bolje prilagodili hladnim in kratkim poletjem zahodne Evrope kot srednjeameriški genotipi, verjetno pa so bili tudi zaradi večje oblike zrn bolj atraktivni kot srednjeameriški. Angioi in sod. (2010) ocenjujejo, da je relativno velik odstotek (44 %) evropske dednine nastal s hibridizacijo andskega in srednjeameriškega genskega sklada. Kljub temu, da so hibridi prisotni po vsej Evropi, so zelo neenakomerno razporejeni, z visoko frekvenco v osrednji Evropi in v mediteranskem območju Španije in Italije (Angioi in sod., 2010) ter balkanskih državah. Seleksijski pritisk okolja na toleranco na dolg dan, odpornost na bolezni in škodljivce, stres ter selekcijo glede na fenotip, obliko in barvo zrn ter odpornost so botrovali tudi razvoju številnih lokalnih sort, ki jih v Evropi poleg novo požlahtnjenih sort pridelujejo še danes (Šuštar-Vozlič in sod., 2012). Maras in sod. (2008) so z metodo netehtane aritmetične sredine (UPGMA) na osnovi podobnosti, ne glede na vrsto markerja, razvrstili 100 slovenskih genotipov navadnega fižola, poleg referenčnih genotipov, v eno manjšo skupino srednjeameriškega genskega sklada in večjo skupino andskega genskega sklada, v kateri so ugotovili lokalno specifično podskupino.

Navadni fižol je bil do leta 1970 najbolj razširjena kultivirana stročnica v Evropi. Po tem obdobju sta ga zaradi potreb živinoreje prehitela soja in grah. Skupna površina pridelave graha je presegla 1–1,3 Mha, po letu 1990 pa je upadla. Leta 2013 je znašala pridelovalna površina graha, soje oz. boba od 200.000 do 500.000 ha. Povprečno se je površina pridelovanja zrnatih stročnic od leta 1961 do leta 2013 zmanjšala za 5,8–1,8 Mha, kljub temu pa je celotna pridelava stročnic v tem obdobju narasla za 3,3–4,2 Mt (FAOSTAT, 2014).

V Sloveniji smo fižol spoznali kmalu za zahodnoevropskimi narodi. Že Valvasor je v Slavi vojvodine Kranjske (17. stoletje) zapisal, da je pridelava fižola razširjena po vsej deželi. Čeprav letnica vnosa fižola ni znana, lahko na osnovi zgodovinskih dokumentov, kot so srednjeveški urbarji, kuharske knjige in zgodovinopisje, vsaj v grobem rekonstruiramo distribucijske poti fižola v slovenskem prostoru v preteklih stoletjih (Maras, 2007). Skozi stoletja kontinuirane pridelave so se ob različnih klimatskih in talnih razmerah, veliki pestrosti krajine, izoliranosti ter zaradi različnega načina pridelave in uporabe v Sloveniji razvile številne avtohtone populacije in sorte fižola (Šuštar-Vozlič in sod., 2000). Te se ločijo glede na namen pridelave (za zrnje, stročje ali kombinirano, kot krma za zeleno maso, za zeleno gnojenje in zaščito tal ali kot okrasna rastlina), tip rasti, višino stebela, obliko zrna, barvo zrna, dolžino vegetacije, odpornost na posamezne bolezni, prilagojenost na določene klimatske razmere in določeni načini gojenja (Ivančič, 2002).

V okviru Slovenske rastlinske genske banke na Kmetijskem inštitutu Slovenije desetletja vzdržujejo zbirko fižola z več kot 1000 genskimi viri, ki so bili zbrani na območju Slovenije. V zbirki je tudi 61 genskih virov, pridobljenih v sodelovanju v mednarodnih ekspedicijah v tujini, ter 39 virov, ki so bili pridobljeni za potrebe raziskovalnega dela iz

drugih genskih bank v Evropi in svetu. Večino slovenskih virov predstavlja navadni fižol (*Phaseolus vulgaris* L.), manjši delež je turškega fižola (*P. coccineus* L.) (Šuštar-Vozlič in sod., 2000). S pomočjo analize tipa fazeolina (glavna založna beljakovina) je Maras (2007) določil poreklo slovenskim genotipom navadnega fižola.

2.1.2 Osnovne lastnosti

Po botanični klasifikaciji uvrščamo navadni fižol (*Phaseolus vulgaris* L.) v tretjo največjo družino rastlin, med metuljnice (Fabaceae), ki sodijo za travami (Poaceae) v drugo agronomsko najpomembnejšo družino rastlin. Metuljnice obsegajo skupaj 650 rodov in približno 18.000 vrst. Družina Fabaceae pripada redu Fabales (stročnice), nadredu Rosanae, podrazredu Rosidae, razredu Magnoliopsida (dvokaličnice), pododdelku Magnoliophytina (kritosemenke) in oddelku Spermatophyta (semenovke). V rod *Phaseolus* sodi skupno 50–60 vrst. Poleg navadnega fižola (*P. vulgaris* L.) so kultivirane še štiri vrste: *P. coccineus* L. (turški fižol), *P. lunatus* L. (limski fižol), *P. polyanthus* Greenm. (sinonim: *P. dumosus* McFady.) in *P. acutifolius* A. Gray. Gepts in sod. (1999) so z analizo sekvence α -amilaze inhibitorke gena ocenili, da naj bi se *P. vulgaris* od njemu najbolj podobnih vrst, *P. polyanthus* in *P. coccineus*, ločil 2 milijona let nazaj. Najdlje v sorodu pa naj bi si bili *P. vulgaris* s *P. lunatus* (Delgado-Salinas in sod., 2006).

Po vzniku navadnega fižola najprej zrastle srčasta celoroba prava lista, vsi naslednji listi so tridelni, z dolgimi listnimi peclji in prilisti, z najmočnejše razvitim srednjim lističem. Barva listov je svetlo rumena do temno zelena, so dlakavi in na listnih žilah so sledovi antocianidinov. Oblika listov je lahko srčasta, jajčasta, romboidna ali suličasta (Singh, 1991). Po tipu rasti in po višini stebela delimo sorte fižola v nizke ali grmičarje ter visoke ali preklarje (Černe, 1997). Cvetovi izraščajo iz nodijev, so dolgi 1–1,5 cm, dvospolni in posamični ali dvojni pri tleh, višje na viti pa so združeni v socvetje s po 3–8 cvetovi. Cvetno odevalo je sestavljeno iz cevasto-zvončaste čaše s petimi čašnimi listi in iz različno obarvanih venčnih listov. Zadnji so sestavljeni iz dveh stranskih kril, jadra ali zastavice, ki je zgoraj, in je daljša od kril, spodaj pa lista sestavljata ladjico. Devet prašnikov je zraslih v cev, deseti je prost (Graham in Ranalli, 1997). Plodnica je nadrasla, vrat brazde je zgoraj dlakav, v sredini razširjen in spiralasto zavrt. Fižol je večinoma samoprašna rastlina, vendar je možno tudi opraševanje s tujim cvetnim prahom. Delež tujeprašnosti naj bi bil po poročanju nekaterih avtorjev od 0,2 do 1,4 % (Pacova and Rocha, 1975, cit. po Ferreira in sod., 2007; Pereira Filho and Cavarani, 1984, cit. po Ferreira in sod., 2007). Pompeu (1963) je poročal o 6,0 % tujeprašnosti, Wells in sod. (1988) pa tudi nad 50 % (cit. po Ferreira in sod., 2007). Plod fižola je strok z nitjo ali brez nje, razvijati se začne 10–15 dni po cvetenju. Je zelen, rumen ali pisano obarvan, raven do ukrivljen, na prerezu okrogel, ploščat ali ploščato-okrogel (Černe, 1997). Seme fižola je dolgo do 2 cm ter široko 0,7–1,1 cm. Lahko je bele, rumene, rožnate, temno rdeče, vijolične, sive, rjave, črne ali pisane barve, po obliki pa okroglo, ledvičasto, eliptično ali podolgovato-ovalno. Po debelini in teži je zelo različno, masa 100 semen pa sega od 20 g do 200 g. Seme fižola obdrži kalivost tri do štiri leta, odvisno od načina shranjevanja (vlaga, temperatura). V genski banki, ob pravilnem hranjenju, tudi 10 let in več. Ob ugodnih razmerah fižol vznikne po sedmih do desetih dneh po setvi, v manj ugodnih, to je pri nižji temperaturi, pa po 20 do 22 dneh. Nizke in zgodnje sorte v ugodnih rastnih razmerah od setve do tehnološke zrelosti

potrebujejo od 50 do 70 dni. Visoke sorte dosežejo tehnološko zrelost kasneje, od 100 do 130 dni po setvi (Graham in Ranalli, 1997; Černe, 1997).

Fižol na prosto sejemo maja, ko se temperatura tal dvigne nad 10 °C, saj zahteva toplo in vlažno okolje že med kalitvijo. Cveteti začne pri temperaturah od 18 do 25 °C, pri temperaturah pod 15 °C in nad 30 °C ne cveti. Cvetovi odraslih rastlin v jeseni odpadejo, ko se temperatura spusti pod 7 °C, pri temperaturi –0,1 °C pa rastlina fižola pozebe (Graham in Ranalli, 1997; Černe, 1997). Fižol slabo prenaša vročino in sušo, kar močno vpliva na količino in kakovost pridelka. Visoke temperature negativno vplivajo na dolžino strokov, število semen v stroku in maso semena. Pri visoki temperaturi in nizki relativni zračni vlagi odpadejo cvetovi in mladi stroki (Munoz-Perea in sod., 2006). Poleg relativne zračne vlage potrebuje fižol tudi veliko vlage v tleh. Optimalna talna vlaga za rast fižola znaša 60–75 % poljske kapacitete tal, optimalna relativna zračna vlaga pa 65–80 %. Ob preveliki zračni vlagi in visokih temperaturah rastlinam fižola odpadejo cvetovi in te postanejo občutljivejše za bolezni (Graham in Ranalli, 1997; Černe, 1997). Izvorno je fižol rastlina kratkega dne, vendar je večina danes gojenih genotipov nevtralna glede dolžine dneva. Lahka ilovnata tla s pH od 5,5 do 7,0 in bogata z organsko snovjo so najprimernejša za pridelovanje navadnega fižola (Singh, 1999; Černe, 1997).

Navadni fižol pridelujejo zaradi svežih/zelenih strokov, zelenih oluščenih semen in zrelih semen. Fižol, ki ga pridelujemo za stroke, imenujemo stročji fižol. Polno razviti stroki so lahko pod kožico stroka in v šivu vlaknasti ali ne. V svetu se prideluje največ fižola za zrnje, manjša je pridelava stročjega fižola (FAOSTAT, 2014). Zeleni listi, stebila in luščine strokov so krma za govedo, suhe rastline fižola pa so uporabne za steljo goveda za povečanje organske snovi skupaj z izločki goveda ali za gorivo (Singh, 1999).

Pri navadnem fižolu predstavljajo beljakovine 20 % suhe snovi, od teh je do 80 % založnih (Sparvoli in Bollini, 2014). Poleg beljakovin je navadni fižol bogat vir vlaknin, ogljikovih hidratov, vsebuje pa tudi številne vitamine in minerale, kot so železo, magnezij, kalij, selen in kalcij (Broughton in sod., 2003; Graham in sod., 2007; Blair, Sadoval in sod., 2009; Blair, Wu in sod., 2016). Zaradi visoke vsebnosti ogljikovih hidratov, 20–60 % vseh sestavin v zrnu, ima suho fižolovo zrnje visoko energijsko vrednost, saj 100g vsebuje 80–340 kkal (USDA, 2016). Madhujith in sod. (2004) poročajo o pomembni vsebnosti antioksidantov, zaradi katerih ima fižol tudi zdravilne učinke. Redno uživanje fižola prispeva k zmanjšanju holesterola in vsebnosti sladkorja v krvi ter posledično blaži nekatere vrste rakavih obolenj, sladkorno bolezen tipa 2 in kardiovaskularne bolezni (Arnoldi in sod., 2015; Duranti, 2006). Fižol mora biti pred zaužitjem ustrezno pripravljen, saj v nasprotnem primeru vsebuje tudi nekatere antinutricionistične komponente (npr. lektine) (Batista in sod., 2010).

2.1.3 Žlahtnjenje

Začetki žlahtnjenja navadnega fižola so bili osredotočeni predvsem na izboljšanje odpornosti navadnega fižola na različne bolezni in na prilagoditev različnim okoljskim razmeram. Kasneje je bil poudarek tudi na kakovosti pridelka, habitusu rastline in količini pridelka (De Rone in sod., 2015). Pomembne spremembe v pridelavi fižola so se v ZDA

pojave že leta 1917, ko se je začela pridelava iz osrednjega dela širiti proti zmerno toplem zahodnem delu ZDA, kjer je danes največja pridelava fižola (Brick in Lowry, 2000). Vzrok selitve je bil izbruh bolezni fižola, kot sta fižolov ožig (povzroča ga gliva *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus)) in fižolova bela gniloba (povzroča jo gliva *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary), ki sta postali resen problem področij, kjer fižol komercialno pridelujejo (Adams, 1996). Poleg fižolovega ožiga in bele gnilobe na produktivnost navadnega fižola vplivajo tudi druge glivičnih bolezni, kot so rja (povzroča jo gliva *Uromyces appendiculatus* (Pers.:Pers) Unger), siva plesen (povzroča jo gliva *Botrytis cinerea* Pers.:FR) in gnitje korenin, bakterijske bolezni, kot so navadna bakterijska snet (povzroča jo bakterija *Xantomonas axonopodis* pv. *phaseoli*), obročkasta snet in bakterijska rjava pegavost (povzroča jo *Pseudomonas syringae*) in virusne okužbe, kamor prištevamo virus navadnega mozaika fižola – BCMV (angl. bean common mosaic virus), virus rumenega mozaika fižola – BYMV (angl. bean yellow mosaic virus) in virus zvijanja listov fižola – BLRV (angl. bean leafroll virus).

Fižolov ožig lahko povzroči tudi do 100 % izgubo pridelka (Schwartz in sod., 2005), do 80 % izgube lahko povzroči virusni mozaik, navadna bakterijska snet pa okoli 22 %. Vse tri bolezni se večinoma prenašajo s semeni, predvsem fižolov ožig in bakterijska snet pa lahko tudi z rastlinskimi ostanki (Schwartz in sod., 2005). Velik napredek pri omejevanju in preprečevanju teh bolezni je žlahtnjenje odpornih sort. Velik odstotek sort je že odpornih na fižolov navadni virusni mozaik, v nekaterih primerih tudi v kombinaciji z odpornostjo na katero drugo bolezen. Redko je sorta odporna na tri ali celo več različnih bolezni (Singh in sod., 2007; Teran in sod., 2009; Singh in Schwartz, 2010). Boersma in sod. (2013) so s kombinacijo konvencionalne metode ponovnega križanja in selekcijo s pomočjo molekulskih markerjev uspešno vnesli gene za odpornost na navadno bakterijsko snet v sorto Manitoba in s tem združili odpornost na navadno bakterijsko snet z odpornostjo na fižolov ožig v belem grahavem fižolu ter z odpornostjo na virusni mozaik pri črnem in »pinto« fižolu.

Pomemben napredek je bil narejen pri sortah z izboljšano odpornostjo na določeni škodljivci ali nematode, vendar pa je sortiment z odpornostjo na eno ali več škodljivih organizmov oz. na nematode majhen (Singh in Schwartz, 2010).

Drugi biotski stresni dejavniki navadnega fižola so tudi škodljivci, kot so fižolar, črna fižolova listna uš, škržat in fižolova muha. Na rast in razvoj ter količino in kakovost pridelka vplivajo tudi pleveli, kar pa je močno odvisno od razmer okolja (temperatura, vlaga), agronomskih ukrepov, stanja zemljišča pred setvijo fižola, sistema pridelave, obdelovanja tal, rastnih razmer in tekmovalne sposobnosti posamezne sorte, gostote setve, razpoložljivosti vode in kontrolnih meritev (Singh in sod., 2009; Singh in Schwartz, 2010).

Med najpomembnejšimi lastnostmi za selekcijo in priporočilo sorte navadnega fižola je velikost pridelka, vendar je ta lastnost zelo kompleksna, poligensko dedovana in močno odvisna od razmer okolja (Torga in sod., 2013). V žlahtniteljskih programih je za uspešno pridobitev sort z visokim pridelkom treba zagotoviti zadostno gensko raznolikost in učinkovite strategije za določanje razlik pri elitnih genotipih za doseg zastavljenih ciljev. Dejavniki, ki najbolj vplivajo na učinkovitost tega procesa, so interakcije med genotipom

in okoljem ter izbira primerne žlahtniteljske metode za segregacijsko populacijo, ki sledi izboru ustreznih staršev (Pontes Junior in sod., 2016).

Med abiotskimi stresnimi dejavniki, ki omejujejo pridelek fižola, je v splošnem najpomembnejša slaba rodovitnost tal, predvsem pomanjkanje fosforja, problematična je tudi toksičnost aluminija in mangana (White in Brown, 2010). V zadnjih letih je zelo pogost stresor suša, ki se v večji alimanjši meri pojavlja na večini pridelovalnih površin fižola po celem svetu (White in sod., 1988; Beebe, 2012; Assefa in sod., 2015). Velikost pridelka, toleranca na sušni stres, prilagoditev na pomanjkanje fosforja v tleh in hranilne lastnosti so prioritete lastnosti, h katerim težijo žlahtnitelji navadnega fižola že od leta 1990 (Broughton in sod., 2003).

V preteklosti so bile na Kmetijskem inštitutu Slovenije preko individualne odbire iz avtohtonih populacij požlahtnjene 4 sorte navadnega fižola ('Zorin', 'Klemen', 'Jabelski pisanec', 'Jabelski stročnik'). Na osnovi večletnega vrednotenja, selekcije in opravljenih analiz več kot 30 genskih virov tipov češnjevcev in lišček so odbrali dve akcesiji, dve novi ohranjevalni sorti navadnega fižola, ki sta bili leta 2016 vpisani v Sortno listo Republike Slovenije ('Češnjevcev pisani visoki' in 'Lišček rdeči marmorirani') (Šuštar-Vozlič in sod., 2017). Cilji žlahtnjenja novih sort so toleranca na sušni stres, odpornost – predvsem na fižolov ožig in virusne okužbe, zgodnejše cvetenje, visok in kakovosten pridelek.

Vandemark in sod. (2014) poročajo, da je doprinos genetskih raziskav osnovnih lastnosti navadnega fižola k povečanju pridelka v zadnjih tridesetih letih 13,9 kg/ha/leto, kar znaša 0,77 % na leto. Nadaljnje vključevanje genskega zapisa drugih genotipov navadnega fižola v nove sorte naj bi omogočilo nov vir genske raznolikosti za povečanje pridelka v prihodnosti (Vandemark in sod., 2014).

Cilj žlahtnjenja rastlin je povečati število zelenih alelov za določeno produktivno stanje rastline. Verjetnost, da bi dosegli kombinacijo vseh zelenih alelov za kvantitativno lastnost pri enem genotipu je zelo majhna. Za izboljšanje kvantitativnih lastnosti, kot sta semenski pridelek in toleranca na abiotske dejavnike, je potrebna večkratna selekcija in rekombinacija (De Rone in sod., 2015).

Nova metoda selekcije, tj. selekcija s pomočjo markerjev (angl. MAS – marker assisted selection) se je razvila v poznih devetdesetih letih, kjer se uporabljajo potencialni markerji DNA kot molekulsko orodje pri žlahtnjenju rastlin (Ribaut in Hoisington, 1998). MAS omogoča selekcijo genov, ki kontrolirajo zelene lastnosti s prisotnostjo ali odsotnostjo markerja. Združeno s tradicionalno tehniko fenotipske selekcije, je MAS postala učinkovito, efektivno, zanesljivo in cenovno ugodno orodje v primerjavi z bolj konvencionalno metodologijo žlahtnjenja rastlin (Bhanu in sod., 2016).

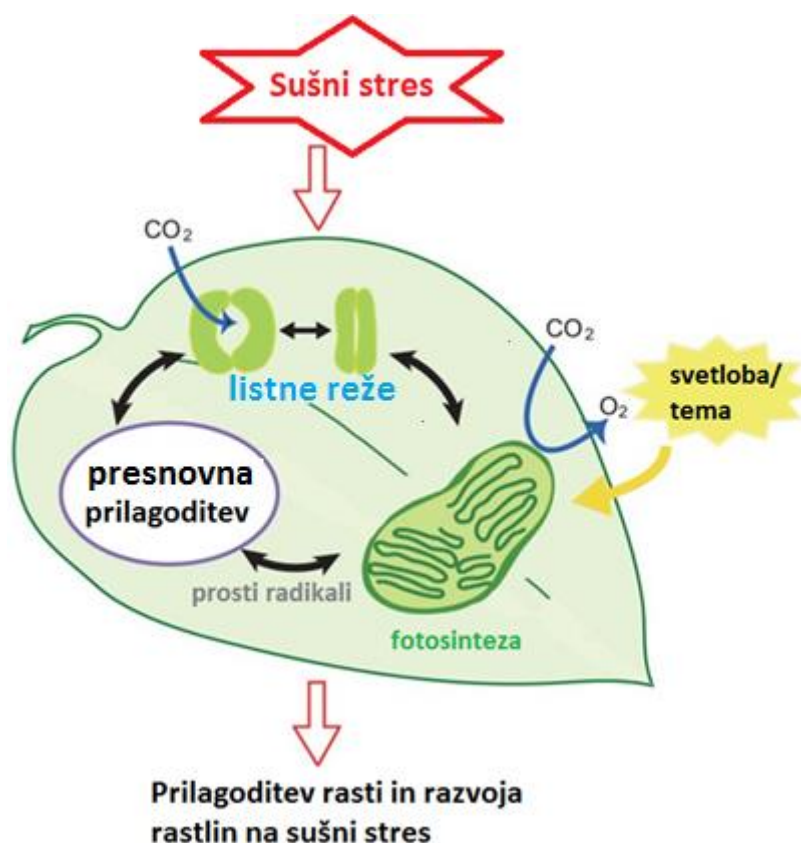
2.2 ODZIV RASTLIN NA SUŠNI STRES

2.2.1 Sušni stres

Številni abiotiski dejavniki, kot so suša, slanost, ekstremne temperature (zelo visoke ali zelo nizke), slaba oz. premočna osvetlitev, pomanjkanje ali toksične vrednosti hranil imajo izrazit vpliv na količino pridelka (Boyer, 1992; Rao in sod., 2013). Abiotiski dejavniki vplivajo tudi na različno razporeditev rastlinskih vrst v različnih tipih okolja (Chaves in sod., 2002). Neenakomernost in nepredvidljivost klimatskih sprememb zahtevata razvoj strategij za ohranjanje ali izboljšanje količine in kakovosti pridelka v območjih s specifičnim podnebjem (Beebe in sod., 2011).

Toleranca na sušo je zapletena poligenska lastnost, povezana z odzivi na različnih nivojih; odraža se na ravni celic in rastlinskih organov. Odziv na sušni stres je vrstno specifičen in pogosto tudi odvisen od genotipa (De Leonardis in sod., 2012). Rastline uporabljajo različne morfološko-anatomske prilagoditve in fiziološke oz. presnovne mehanizme, ki se odražajo tako na ravni celic kot tudi na rastlinskih organih. Odziv rastline na sušni stres je odvisen od številnih dejavnikov, kot so: stadij razvoja, v katerem se rastlina sooči s stresom, jakost stresa ali od kombinacije dejavnikov okolja (visoka temperatura, svetlobna jakost idr.). Vpliv suše je odvisen od intenzitete, tipa in dolžine sušnega stresa (Beebe in sod., 2013).

Suša vpliva na vsebnost vode v rastlini, prevodnost listnih rež in na presnovne mehanizme, ki so odraz različnega odziva rastlin (Slika 1). Rastline se odzovejo na sušni stres z mehanizmi, s katerimi se ji izognejo ali jo (do neke mere) tolerirajo (Beebe in sod., 2013). Rastline se lahko suši izognejo tako, da zaključijo svoj življenjski krog preden pride do močnega pomanjkanja vode v zemlji in rastlini. Ta mehanizem privede do zgodnejšega cvetenja in oblikovanja ter zrelosti strokov, do zgodnjega odpadanja listov, do razvojne plastičnosti ali do prerazporeditve produktov fotosinteze v semena (Araus in sod., 2002). Nekatere rastline v izogib suši povečajo sprejem vode in zmanjšajo njeno izgubo (Chaves in sod., 2002). Sprejem vode je lahko izboljššan z učinkovitejšo absorpcijo vode, večjo globino koreninjenja in s povečanjem hidravlične prevodnosti ter z zmanjšanjem evapotranspiracije iz nadzemnih delov. Pomembno vlogo pri prehajanju vode skozi celične membrane (plazmalema, tonoplast) imajo intrinzični membranski proteini, akvaporini (Hussain in sod., 2011). Njihova biološko pomembna sposobnost je uravnavanje transporta vode skozi membrane v razmerah, kjer je prilagoditev rastline na pretok vode fiziološko kritična (Luu in Maurel, 2005). Toleranca na sušo je v osnovi sposobnost rastline toleriranja zelo nizkega vodnega potenciala in padca turgorja. Nekatere tolerantne rastline ohranjajo kolikor toliko ugoden turgor (npr. z osmotsko prilagoditvijo, elastičnostjo celičnih sten) in ne dovolijo, da bi ta komponenta vodnega potenciala preveč padla. White in Castillo (1992) sta na podlagi meritev na steblih in koreninah tolerantnih ter občutljivih genotipov potrdila, da k toleranci pomembno vplivajo lastnosti koreninskega sistema. Rezultati raziskave genotipa 'BAT477' in 'San Cristobal' kažejo, da so se rastline fižola izognile sušnemu stresu z globljim koreninjenjem (Sponchiado in sod., 1989). Najpomembnejši mehanizem izogibanja sušnemu stresu je kontroliranje prevodnosti listnih rež, s čimer rastlina med vegetativno fazo omeji transpiracijo, da bi ohranila vodno bilanco (Osakabe in sod., 2014).



Slika 1: Odziv rastline na sušni stres (Osakabe in sod., 2014).

Figure 1: Plant response to drought stress (Osakabe in sod., 2014).

Pravi izziv je povečati učinkovitost izrabe vode za transpiracijo, ko te primanjkuje (Blum, 2009). Zato je treba dobro preučiti parametre, ki vplivajo na učinkovito kontrolo prevodnosti listnih rež (Sinclair, 2012).

Problem pridelovanja navadnega fižola je v velikem deležu pridelovalnih površin v regijah z manjšo količino padavin. Suša povzroča tudi do 60 % zmanjšanje pridelka in poslabšanje njegove kakovosti (Beebe in sod., 2011; White in Singh, 1991). Znano je, da je navadni fižol občutljiv na sušo – še posebno med fazo cvetenja in razvojem strokov (Fernandez in sod., 1986; Fageria in sod., 2010). Zmerno močna suša največkrat vodi v zmanjšanje rastlinske mase navadnega fižola, zmanjšanje števila semen na strok, zgodnjo zrelost, zmanjšanje pridelka in teže semena ter zmanjšanje možnosti vezave dušika (Ramirez-Vallejo in Kelly, 1998). Razvoj sušnim razmeram prilagojenih sort fižola je pomemben korak k zmanjšanju izgub pridelka in izboljšanju prehranske varnosti še posebej v državah, kjer pridelujejo fižol na območjih pomanjkanja vode (Beebe in sod., 2011).

2.2.2 Morfološki in fenološki odziv

Morfološke lastnosti predstavljajo prve markerje oz. znake, uporabljene pri vezanem kartiranju. Na podlagi opazovanj morfoloških lastnosti je bila kot prva izdelana genska karta vinske mušice (*Drosophila melanogaster*) (Sturtevant, 1913). Vključujejo gene, ki so

večinoma nastali z mutacijami, in vplivajo na morfologijo rastline. So lahko pod močnim vplivom dejavnikov okolja. Na splošno je morfoloških markerjev, ki se dedujejo v kakršni koli genetski populaciji, premalo za razvoj tesne vezave s specifično ekonomsko pomembno lastnostjo. Še več, veliko morfoloških mutacij je pri žlahtniteljskih populacijah škodljivih ali nezaželenih, zato imajo kot opazovani markerji omejeno uporabnost. Z večanjem števila markerjev na genski karti njihova uporabnost za selekcijo genov in lastnosti, ki jih je navadno težko žlahtniti, postaja vedno bolj očitna.

Velikost semena je bila primarna morfološka lastnost uporabljena za ločevanje med genskima skladoma. Poleg te lastnosti so bile razlike tudi v velikosti in obliki lista ter brakteole, barvi cveta, dolžini internodija in poziciji kljuna stroka (Singh in sod., 1991).

Fenološki podatki rastlin predstavljajo pomemben del selekcije genotipov, tolerantnih na sušo, ker odražajo prilagajanje življenjskega kroga rastline določenim sušnim razmeram v okolju. Zgodnost je učinkovita strategija žlahtnjenja za povečanje stabilnosti pridelka v mediteranskem podnebj, kjer so rastline izpostavljene sušnem stresu, čeprav lahko ekstremna zgodnost privede do slabšega pridelka. Zgodnje cvetenje lahko pomaga pri izogibu suše, ne pomeni pa tolerance na sušni stres (De Leonardis in sod., 1012). Izboljšanje tolerance na več abiotičnih stresnih dejavnikov je bolj produktivno, kot toleranca na en sam abiotični stres (Yang in sod., 2013).

2.2.3 Fiziološki odziv

Fotosinteza in celična rast sta primarna procesa, na katera vpliva suša (Chaves, 1991). Omejitev prevodnosti listnih rež v začetni fazi suše negativno vpliva na fotosintezo zaradi omejene difuzije ogljikovega dioksida v listih in pomanjkanja tega plina v mezofilu. Ta stomatalna omejitev sovpada s prebitkom energije v fotosinteznem tilakoidnem aparatu, ki vodi do fotoinhibicije (zmanjšanja fotokemične učinkovitosti) (Chaves, 1991; Chaves in sod., 2002). Aktivnost fotosinteznega aparata se zmanjša, ko je rastlina izpostavljena močnejši suši in njen vodni potencial pade pod določen prag (odvisno od vrste rastline), kar potrjuje povišana vsebnost CO₂ (Brodribb, 1996) in zmanjšana aktivnost rubiska (Vu in sod., 1998). Rezultati prikazujejo tesno povezanost med prevodnostjo listnih rež in zmanjšanjem asimilacije CO₂. Rastline, ki so bolj tolerantne na sušo z odzivom na celičnem nivoju, so pogosto sposobne obdržati listne reže odprte tudi v močnejši suši. To jim omogoča sprejemanje CO₂ – nadaljevanje fotosintezne aktivnosti – in prispeva k večji toleranci fotosinteznega aparata na pomanjkanje vode (Brestic in sod., 1995). Za boljše razumevanje odziva rastlin navadnega fižola na sušni stres je pomembno prepoznati in razumeti fiziološke procese, ki v različnih stopnjah suše pripomorejo k odzivu posameznega genotipa navadnega fižola na sušo. Identifikacija tolerantnih in netolerantnih sort navadnega fižola večinoma temelji na rezultatih meritev fizioloških procesov, na katere vpliva suša.

Costa Franca in sod. (2000) so izpostavili štiri sorte navadnega fižola iz Braziliije, A320, Carioca, Ouro Negro in Xodó, sušnemu stresu z namenom, ovrednotiti mehanizme prilagoditve rastline na ta stres skozi analize parametrov rasti, vodnega statusa, izmenjave plinov in indikatorje mehanizmov tolerance na celičnem nivoju. Kljub temu, da so

omenjene sorte kultivirane na enakem geografskem območju, so prikazale različno stopnjo prilagoditve na podaljšan sušni stres med vegetacijsko dobo. V primeru kratkega obdobja suše se je izkazalo, da je prevodnost listnih rež učinkovit prilagoditveni odziv, saj fotosintezni aparat ni bil poškodovan, pri daljši suši pa rastlinam do boljše/močnejše tolerance omogočajo specifični biokemični mehanizmi na celičnem nivoju. Ugotovili so, da je padec vnosa CO₂ odvisen od zapiranja in odpiranja listnih rež in od nestomatalnih komponent. Zgodnje zapiranje listnih rež, fotosinteza in rast, zadrževanje vode v tkivu, osmotski potencial in odpornost membran so uporabni parametri tolerance na sušo, vendar je razmerje med njimi in odziv rastline navadnega fižola na sušo kompleksno ter odvisno od intenzitete in smeri suše (Costa Franca in sod., 2000).

Lizana in sod. (2006) so spremljali pridelek in aktivnost fotosinteznega aparata, da bi ugotovili ali genotipi navadnega fižola v različnih okoljskih razmerah različno reagirajo na sušo. Na sorto navadnega fižola z nadpovprečnim pridelkom kontrolnih rastlin je suša močno vplivala, na drugo sorto, z manjšim pridelkom kontrolnih rastlin, pa vpliv suše na podlagi meritev stomatalne prevodnosti, stopnje fotosinteze, sinteze abscizinske kisline in odpornosti na fotoinhibicijo ni bil drastičen.

Rosales in sod. (2013) so primerjali različni in na sušo tolerantni sorti navadnega fižola dveh genskih skladov, 'Carioca' ter 'Pinto Vila' iz skupine Durango (srednjeameriški genski sklad) in 'ICAPalmar' ter 'Canario-60' iz skupine Nueva Granada (andski genski sklad), v treh različnih okoljih. Rezultati so pokazali, da je tolerantna sorta ob suši omejila izgubo vode zaradi zapiranja listnih rež čez dan in obdržala visoko vsebnost vode v rastlini čez noč – v primerjavi z občutljivo sorto. Z možnostjo uravnavanja vsebnosti vode je dosegla zadovoljiv pridelek tudi v sušnih razmerah.

Rosales in sod. (2012) so na dveh na sušo različno tolerantnih sortah fižola ('Bayo Madero' in 'Pinto Saltillo') poleg nekaj parametrov presnovnih procesov (relativne stopnje rasti, akumulacije prolina, aktivnosti glikozilat oksidaze) spremljali tudi fiziološke, kot so: netofotosinteza, transpiracija, prevodnost listnih rež, učinkovitost izrabe vode, vsebnost vode v listih in antioksidativni odziv. Rezultati so pokazali, da je prednost sorte 'Pinto Saltillo', tolerantne na sušo, v tem, da obdrži količino pridelka tudi v močnejši suši zaradi zgodnjega odziva prevodnosti listnih rež, ohranjanja fotosintezne aktivnosti, povečanja učinkovitosti izrabe vode in omejevanja akumulacije reaktivnih kisikovih spojin (prostih radikalov).

Ruiz-Nieto in sod. (2015) so za namen izolacije in identifikacije fragmentov genov, povezanih z odzivom na sušo, določenih pri mutantu alx8 navadnega repnjakovca, kot diferencialni odzivni mehanizem na pomanjkanje vode okarakterizirali učinkovitost izrabe vode pri dveh na sušo različno tolerantnih sortah navadnega fižola ('Pinto Saltillo' in 'Bayo Madero'). Ocenili so tudi stopnjo izražanja predhodno identificiranih genov. Zaradi zmožnosti ohranjanja visoke fotosintezne aktivnosti in asimilacije CO₂ je bila izraba vode učinkovitejša pri bolj tolerantni sorti 'Pinto Saltillo' v primerjavi z netolerantno sorto 'Bayo Madero'. To razloži tudi zmožnost sorte 'Pinto Saltillo' večje produkcije semen z manjšo količino razpoložljive vode.

Linije, ki so imele pod sušnim stresom večji pridelek, so pokazale boljšo prerazporeditev fotosinteznih produktov pri nastanku strokov in semen (Beebe in sod., 2008; Rao in sod., 2009; Beebe in sod., 2013; Rao in sod., 2013). S tem se je povečal indeks pridelka (angl. harvest index – HI), kar so potrdile tudi študije, v katerih je navedeno, da je ohranjanje visokega HI v razmerah s pomanjkanjem vode ključ do tolerance na sušo (Ramirez-Vallejo in Kelly, 1998; Klaedtke in sod., 2012; Habibi, 2013). Indeks pridelka strokov ($PHI = (\text{masa zrnja/celotna masa strokov}) \times 100$) se uporablja kot indikator zmožnosti premeščanja fotosinteznih produktov v stresnih razmerah (Rao in sod., 2013).

Na osnovi rezultatov meritev vodnega potenciala in propustnosti membran pri devetih sortah navadnega fižola iz SRGB v sušnem stresu so ugotovili, da je na sušo najbolj tolerantna sorta 'Tiber', najmanj pa sorta 'Starozagorski črn' (Hieng in sod., 2004). Prav tako so rezultati fizioloških meritev TRAP (angl. Total Radical-Trapping Potential) in reflektometrije pokazali, da je sorta 'Tiber' bolj tolerantna na sušni stres, vendar ta ni bil pri nobeni sorti tako močan, da bi povzročil nepovratne spremembe fotosinteznega aparata (Razinger in sod., 2010).

2.2.4 Molekulski markerji in njihova uporabnost pri študijah sušnega stresa

Medtem ko fiziološke meritve, anatomske in osnovne biokemijske analize rastlin omogočajo boljše razumevanje kompleksnega prepleta s sušo povezanih lastnosti, molekularna biologija in genomski pristop omogočata identifikacijo kandidatnih genov ter kvantitativnih lokusov povezanih s temi lastnostmi (Mir in sod., 2012).

Razvoj molekulskih markerjev je po letu 1980 omogočil močan napredek v žlahtnjenju, ki omogoča selekcijo s pomočjo markerjev in karakterizacijo QTL. Molekulski oziroma markerji DNA so specifični deli sekvence DNA, ki se med osebki razlikujejo in jih zlahka določimo ter spremljamo. Njihova uporaba temelji na variacijah fragmentov DNA, ki jih imenujemo polimorfizmi, saj se dedujejo po Mendlovih pravilih. Pomembne lastnosti molekulskih markerjev so: visoka polimorfnost, ko-dominantnost, enakomerna in pogosta razporeditev po celotnem genomu, enakost v različnih razmerah okolja, dostopnost, hitra in poceni detekcija, enostavni in hitri postopki analize, visok izplen ter enostavna izmenjava in primerjava podatkov med laboratoriji (Nishant Bhanu in sod., 2016). Vrednotenje polimorfizmov markerjev DNA, ki se kažejo kot spremembe enega nukleotida, manjši ali večji vstavki oz. izrezi nukleotidov ali dolžinske različice ponavljajočih sekvenc, nam preko analize potomstva oz. populacije omogoča pridobivanje pomembnih informacij določene lokacije (lokusa) v genomu, ki je povezan z neko fenotipsko lastnostjo.

Uporaba genetskih in genomskih analiz za identifikacijo DNA-molekulskih markerjev, povezanih s toleranco na določeni stres, olajša strategije žlahtnjenja za izboljšanje pomembnih kmetijskih rastlin (Perez-Clemente in sod., 2012). Tak pristop je še posebno uporaben pri tarčnih lastnostih, ki jih kontrolira več genov, kot v primeru sušnega stresa.

2.2.5 Odziv rastlin na sušo na biokemijskem nivoju

Rastline se odzivajo na sušo tudi z različnimi biokemijskimi procesi. Nekateri biokemijski markerji, ki razlikujejo različno stopnjo tolerance med genotipi navadnega fižola na sušni stres, so že opisani, med njimi tudi vodni kanali imenovani akvaporini (AKP) (Montalvo-Hernández in sod., 2008; Recchia in sod., 2013). AKP sodijo v družino intrinzičnih membranskih proteinov – MIP (angl. membrane intrinsic proteins), ki skozi membrano omogočajo transport molekulam vode in manjšim pozitivnim molekulam ter ionom, kot so Si, B, NH₃, urea, glicerol, CO₂. AKP imajo karakteristično strukturo z ohranjenimi motivi, dva motiva NPA (asparagin-prolin-alanin) in selektivno sito ar/R (aromatično/arginin), ki omogočajo njihovo identifikacijo v genomu (Maurel in sod., 2008; Park in sod., 2015). Uravnavanje transporta vode je zelo pomembna sposobnost rastline pri odzivu na sušni stres. Med-membranski pretok vode je močno povezan s količino in aktivnostjo AKP v celični membrani (Chaumont in Tyerman, 2014). AKP med transpiracijo omogočajo transport vode iz korenin po rastlini skozi liste in ostala tkiva (Maurel in sod., 2008). Vključeni so v različne fiziološke procese, kot so celična diferenciacija in elongacija, transpiracija rastline in regulacija pretoka vode po rastlini (Gomes in sod., 2009; Li in sod., 2014), kar pomeni, da imajo AKP pomembno vlogo pri odzivu rastline na različne stresne dejavnike.

V rastlinah so prisotni različni AKP, ki tvorijo veliko družino proteinov, saj npr. pri navadnem repnjakovcu (*Arabidopsis thaliana*) poznamo 35 homologov (Johanson in sod., 2001) in 71 pri bombažu (*Gossypium hirsutum* L.) (Park in sod., 2010). V nedavni raziskavi navadnega fižola (Schmutz in sod., 2014) so, na podlagi primerjav z AKP navadnega repnjakovca na filogenetskem in strukturnem nivoju, identificirali in na nivoju izražanja v različnih rastlinskih organih okarakterizirali 41 kodirajočih sekvenc AKP (Ariani in Gepts, 2015). Glede na to, v katerih membranah se nahajajo, in glede na aminokislinsko sestavo jih razvrščamo v pet poddružin: intrinzični AKP v plazmalem – PIP (angl. plasma membrane intrinsic proteins), v tonoplastu – TIP (angl. tonoplast intrinsic proteins), intrinzični proteini podobni nodulinu 26 – NIP (angl. nodulin26-like intrinsic proteins), majhni bazični intrinzični proteini – SIP (angl. small basic intrinsic proteins) in nekategorizirani X-proteini (XIP) (Park in sod., 2010). Poddružine so razdeljene še v posamezne skupine. AKP, ki so razvrščeni v različne skupine na podlagi primerjav med različnimi rastlinskimi vrstami (Ariani in Gepts, 2015; Sakurai in sod., 2005), niso nujno tudi ortologi.

AKP se v rastlinah, izpostavljenih suši, izražajo različno. Stopnja izražanja variira med različnimi izoformami in tkivih, v katerih se nahajajo AKP, odvisna je od genotipa in vrste rastline ter od prisotnosti simbiotov ali stopnje stresa (Afzal in sod., 2016; Park in Campbell, 2015). Pri modelni rastlini, navadnem repnjakovcu, je bilo izražanje skoraj vseh preučevanih genov poddružin PIP in TIP zmanjšano v sušnem stresu in povečani slanosti (Alexandersson in sod., 2005; Boursiac in sod., 2005). Izjemi sta bila gena *AtPIP1;4* in *AtPIP2;5*, saj se je le pri teh dveh izražanje povečalo (Alexandersson in sod., 2005). Izražanje sedmih genov AKP vinske trte (*Vitis* sp.) se je močno razlikovalo med različnimi izoformami, rastlinskimi organi in v različnih stopnjah sušnega stresa (Galmés in sod., 2007). V listih vinske trte se je, za razliko od koreninskega tkiva, izražanje v močnem sušnem stresu zmanjšalo. Razlike v izražanju ortologov skupin PIP1, PIP2, TIP1

in TIP4 v povezavi s sušo in rehidracijo so bile ugotovljene pri navadnem repnjakovcu (Alexandersson in sod., 2005), jagodnjaku (*Fragaria vesca* L.) (Šurbanovski in sod., 2013) in v povezavi z osmotskim stresom tudi pri kumari (*Cucumis sativus* L.) (Qian in sod., 2015). Ugotovili so, da obstajajo razlike v stopnji izražanja AKP genov istih poddružin med *VvPIP1;1* v koreninah in *VvPIP2;1* v stebelu vinske trte (*Vitis vinifera* L.) (Vandeleur in sod., 2009) ter med *OsPIP1;2* in *OsPIP1;3* v listih ter koreninah riža (*Oryza sativa* L.) (Lian in sod., 2006).

Raziskav o izražanju genov AKP pri navadnem fižolu v sušnem stresu je malo (Aroca in sod., 2006). Znano je, da je izražanje genov AKP v genotipih navadnega fižola z različno toleranco na sušo različno (Montalvo-Hernández in sod., 2008; Recchia in sod., 2013). Povečano izražanje gena AKP, ki je bil kasneje, po novejši nomenklaturi, imenovan *PvPIP2;5* (Ariani in Gepts, 2015), je bilo v listih navadnega fižola, izpostavljenega sušnemu stresu, povezano z zmanjšanjem transpiracije (Aroca in sod., 2006). S pomočjo subtrakcijske cDNA-knjižnice so identificirali AKP v genotipih navadnega fižola, ki so se razlikovali v toleranci na sušo (Montalvo-Hernández in sod., 2008; Recchia in sod., 2013). V koreninah tolerantnega genotipa so v sušnem stresu določili povečano izražanje tonoplastnega AKP (Montalvo-Hernández in sod., 2008), ki je bil kasneje identificiran kot *PvTIP2;3* (Ariani in Gepts, 2015).

Na osnovi nedavnih analiz RNA-transkripta iz različnih organov divjih in kultiviranih fižolovih genotipov so s pomočjo znanih podatkovnih baz identificirali AKP z visoko povprečno stopnjo genskega izražanja v kontrolnih razmerah (*PvPIP1;2*, *PvPIP2;4* in *PvTIP1;1*) in v sušnem stresu (*PvTIP1;1*) (Ariani in Gepts, 2015). Rezultati izražanja temeljijo na analizah podatkov iz podatkovnih baz, zato so za boljše razumevanje vloge genov AKP navadnega fižola potrebne nadaljnje raziskave na rastlinah izpostavljenih sušnemu stresu.

Pomemben del odziva rastlin na spremembe v okolju, torej tudi na abiotski stres, je razgradnja proteinov (Roy-Macauley in sod., 1992; Vierstra, 1993). Encimi, ki po definiciji cepijo peptidne vezi med dvema aminokislinskima ostankoma imenujemo proteaze oz. proteolitični encimi ali peptidaze. Proteaze so prisotne v vseh živih organizmih in so strukturno zelo različne, kar je posledica njihove raznolike specifičnosti za naravne substrate in različnih mehanizmov, s katerimi omogočajo hidrolizo peptidnih vezi (Kidrič in sod., 2014). Glede na osnovno razdelitev proteaze ločimo na endopeptidaze, ki cepijo peptidne vezi v sredini polipeptidne verige, in eksopeptidaze, ki cepijo vezi na terminalnih delih. Karboksipeptidaze cepijo peptidne vezi na C-terminalnem koncu, aminopeptidaze pa na N-terminalnem koncu peptidov. IUBMB-sistem poimenovanja encimov (IUBMB, 2017) uvršča proteaze med hidrolaze in pri nadaljnji klasifikaciji upošteva pozicijo mesta cepitve ter katalitski tip, medtem ko baza MEROPS (MEROPS, 2017) klasificira proteaze le glede na katalitski tip. Glede na specifičnost do substrata in pogosto zaradi pomanjkanja natančne identifikacije, posebno pri rastlinah (Tsiatsiani in sod., 2012), proteaze še naprej delimo glede na njihove katalitične mehanizme.

Raziskave na različnih rastlinskih vrstah so pokazale, da suša vpliva na proteaze na različnih ravneh, med katerimi so tudi razlike v izražanju genov, ki jih kodirajo (Cruz de Carvalho in sod., 2001; Seki in sod., 2002; Bartels in Sunkar, 2005; Contour-Ansel in sod.,

2010; Vaseva in sod., 2012; Simova-Stoilova in sod., 2013; Kidrič in sod., 2014). Prve raziskave o vplivu sušnega stresa na izražanje proteaz segajo v leto 1990. Proteaze, o katerih so najprej in največkrat poročali, so cisteinske proteaze različnih družin, ki so jih našli v različnih rastlinskih vrstah, kot so grah, navadni repnjakovec in *Sporobolus stapfianus* (Brzin in Kidrič, 1995; Ingram in Bartels, 1996; Blomstedt in sod., 1998). Blaga suša je povzročila zmanjšanje akumulacije transkripta genov, ki kodirajo potencialne cisteinske proteaze v listih dveh sort arašida (*Arachis hypogaea* L.), medtem ko je močna suša povzročila povečanje akumulacije transkripta v obeh sortah v začetni fazi, kasneje pa je prišlo do povečanja samo pri tolerantni sorti (Dramé in sod., 2007). Akumulacija transkripta cisteinskih proteaz je bila v raziskavi dveh sort pšenice zavrti v tolerantni sorti in nespremenjena oz. povečana v manj tolerantni sorti pri odzivu na sušo (Simova-Stoilova in sod., 2010). Stopnja izražanja genov cisteinskih proteaz je bila v stebelu laškega muhviča (*Setaria italica*) v odzivu na sušo zmanjšana (Zhang in sod., 2007).

Sušni stres vpliva tudi na izražanje genov aspartatne proteaze. Močno povečano izražanje so ugotovili v zgodnji fazi razvoja semen pšenice, izpostavljeni kombinaciji sušnega stresa in visokih temperatur (Szücs in sod., 2010), ter v listih ajde, izpostavljenih suši, temi in svetlobnim žarkom UV-B (Timotijević in sod., 2010). V koreninah laškega muhviča pa je bilo izražanje aspartatne proteaze v odzivu na sušo zmanjšano (Zhang in sod., 2007). Pri kitajskem fižolu je bilo izražanje aspartatne proteaze konstitutivno in povečano v senescenci (Cruz de Carvalho in sod., 2001, 2004).

Izražanje genov subtilizinu podobne serinske proteaze je bilo v listih dveh sort arašidov zmanjšano, izrazitejše pa pri tolerantnejši sorti (Dramé in sod., 2007). Pri pšenici se je, v zgodnji fazi razvoja semena v kombiniranem sušnem stresu in vročini, izražanje genov serinske proteaze zmanjšalo prej kot pri kontrolnih rastlinah (Szücs in sod., 2010).

Povečano izražanje gena ATP-odvisne FtsH-proteaze so odkrili v listih koruze v sušnem stresu in tretiranju z abscizinsko kislino – ABA (angl. abscisic acid), kar pa ni izboljšalo tolerance te rastline na sušo (Yue in sod., 2010). Poleg stresnih dejavnikov, kot so visoka stopnja slanosti, nizke in visoke temperature, oksidacija, poškodbe in močna svetloba, tudi različno močan sušni stres ni vplival na izražanje kloroplastne ATP-odvisne Clp-proteaze pri navadnem repnjakovcu (Zheng in sod., 2002).

V listih navadnega fižola se je izražanje gena, ki kodira prekurzor fitepsinu podobne kisle aspartatne proteaze, povečalo pri manj tolerantni sorti 'Carioca' v blagem sušnem stresu (VP = -1,0 MPa), pri bolj tolerantni sorti 'IPA' pa samo v močnejši suši (VP = -1,5 MPa) (Contour-Ansel in sod., 2010). V omenjenih sortah navadnega fižola je bilo izražanje genov dveh prekurzorjev aspartatnih proteaz v močnejši suši (VP = -1,5 MPa) večje pri manj tolerantni sorti v primerjavi z bolj tolerantno sorto (Cruz de Carvalho in sod., 2001). Budič in sod. (2013) so ugotovili, da se izražanje genov, ki kodirata serinski proteazi PvSLP1 in PvSLP2 v rastlinah navadnega fižola sorte 'Zorin', izpostavljenih suši, ni spremenilo, kljub temu pa se je proteolitična aktivnost PvSLP2 v listih povečala, odvisno od starosti in pozicije lista. Analiza proteomov navadnega fižola sort 'Tiber' in 'Starozagorski' je pokazala vpliv suše na vsebnost cisteinske proteaze (Zadražnik in sod., 2013). V odzivu na ta stres pri navadnem fižolu sorte 'Zorin' je bilo, vendar le na nivoju aktivnosti proteaz, okarakteriziranih pet aminopeptidaz (PvAP1, PvAP2, PvAP3, PvAP4,

PvAP5) (Budič in sod., 2016). Rezultati raziskave so pokazali, da je suša povzročila povečanje aktivnosti vseh aminopeptidaz v skoraj vseh analiziranih različno starih listih, a v različnih stopnjah, izjema so bile le aktivnosti PvAP4 in PvAP5 v mladih listih.

2.3 GENSKO KARTIRANJE

Gensko kartiranje je določanje relativne pozicije in razdalje med markerji po celotnem kromosomu. Genska karta vrste je tako abstraktni model linearnega zaporedja skupin genov in markerjev. Pri njihovi izdelavi ločimo dva pristopa: gensko kartiranje in fizično kartiranje. Gensko kartiranje temelji na pojavu vezanosti genov (angl. gene linkage) in ugotavljanju pogostosti rekombinacij. Daje nam bolj ali manj natančno oceno rekombinacijskih razdalj med geni ali molekulskimi markerji na istem kromosomu. Fizično kartiranje se opira na citogenetske metode (označevanje kromosomskih fragmentov, *in situ* hibridizacija) in tehnologijo rekombinantne DNA. Z metodami fizičnega kartiranja določimo mesto na kromosomu, kjer se nahajajo geni ali genski markerji. Za to kartiranje so potrebni DNA-vektorji (kozmidi, umetni kromosomi kvasovk – YAC, umetni bakterijski kromosomi – BAC), ki se uporabljajo za kloniranje velikih delov DNA (Čerenak in Javornik, 2008).

Izdelava genske karte zahteva razvoj primerne populacije za kartiranje, določitev velikosti vzorca in markerskega sistema za genotipizacijo, genotipizacijo izbrane populacije z zadostnim številom markerjev in analizo vezanosti z uporabo statističnih programov. Detajlna genska karta z visoko stopnjo pokritosti genoma je predpogoj za lokalizacijo genov ali lokusov kvantitativnih lastnosti, selekcijo s pomočjo markerjev, primerjalno genomiko med različnimi vrstami, je okvir fizičnim kartam in osnova kloniranju genov, ki temeljijo na genski karti. Vezane genske karte so nepogrešljiv pripomoček za identifikacijo genskih regij vplivnejših genov in QTL-agronomskih lastnosti, kot tudi za primerjalne genomske analize (Semagn in sod., 2006).

Zgodovina genetskih raziskav navadnega fižola se je začela že z »očetom« genetike G. J. Mendlom, W. Johannsenom in K. Saxom, ki so z raziskavami na navadnem fižolu pomembno prispevali k temeljnemu odkritju na področju genetike znanosti. Dolžina genoma navadnega fižola je ocenjena od 450 do 550 milijonov baznih parov (Mbp), razporejenih na 11 kromosomih ($2n = 2x = 22$), in je eden od najmanjših genomov med stročnicami, kar je za eksperimentalni organizem prednost. Fižolov genom je le šestkrat in 1.5-krat večji od genomov modelnih rastlin dvokaličnic ter enokaličnic – navadnega repnjakovca in riža.

Prve genske karte navadnega fižola so objavljene po letu 1990. K temu je pripomogel velik napredek v DNA-tehnikah, ki so postale cenovno ugodnejše in so povečale dostopnost molekulskih pristopov. Tako so se odprle tudi večje možnosti in cenovno ugodnejše tehnike izdelovanja genskih kart, ki so omogočile pomemben vpogled v strukturo in organizacijo genoma *P. vulgaris* (Pereira Vianello in Brondani, 2014). Za izdelavo genskih kart je bil ključen razvoj različnih molekulskih markerjev, še posebno RFLP in RAPD. Izoblikovale so se prve karte ločenih populacij z le nekaj sto markerji (Vallejos in sod.,

1992; Nodari in sod., 1993; Freyre in sod., 1998), a podatki še danes služijo kot osnova za usklajevanje informacij starih in novih genskih kart (Galeano in sod., 2011).

Pomemben napredek za gensko kartiranje in prav tako primerjalne genetske študije je bil razvoj kodominantnih mikrosatelitnih markerjev, ki so bili leta 2000 prvič umeščeni na karto navadnega fižola (Yu in sod., 2000). Skupno so razvili in testirali 37 parov začetnih oligonukleotidov za analizo polimorfizmov sorte BAT93 in Jalo EEP558 ter potomcev križanja, rekombinirane inbridirane linije F₇-generacije. Na podlagi analiz dedovanja so na gensko karto umestili 15 polimorfni mikrosatelitnih markerjev in jih razporedili v sedem vezanih skupin. Število mikrosatelitnih markerjev je hitro naraščalo. Grisi in sod. (2007) so razvili 61 novih mikrosatelitnih markerjev in skupno s 106 markerji naredili gensko karto dolžine 606,8 cM samo na osnovi mikrosatelitov. Z razvojem molekulskih markerjev se je razvilo relativno veliko število genskih kart navadnega fižola, ki so se poleg števila in tipa uporabljenih markerjev razlikovale tudi v izboru starševskih genotipov, tipu analizirane segregacijske populacije in analiziranih lastnostih (Beattie in sod., 2003; Blair in sod., 2003, 2006; Broughton in sod., 2003; Kelly in sod., 2003; Rodriguez-Suarez in sod., 2007; Checa in Blair, 2008; Grisi in sod., 2007). Hanai in sod. (2007) so nato objavili novo osnovno gensko karto navadnega fižola z markerji izraženega zaporedja z mikrosateliti – EST-SSR (angl. expressed sequence tags – simple sequence repeats), analognimi polimorfizmi odpornih genov – RGAP (angl. resistance gene analog polymorphism) in markerji AFLP. Skupina 80 mikrosatelitov, 40 EST-SSR in 40 genomskih mikrosatelitnih markerjev je bila testirana za ugotavljanje polimorfizma v 23 genotipih kultiviranih rastlin navadnega fižola iz srednjeameriškega in andskega genskega sklada (Hanai in sod., 2007). Prva študija polimorfizmov posameznih nukleotidov – SNP (angl. single nucleotide polymorphisms) (Galeano in sod., 2009) je na integrirano gensko karto navadnega fižola vključila 118 novih lokusov markerjev. V zadnjih letih število markerjev SNP sunkovito narašča, kar je omogočilo izdelavo goste vezane genske karte navadnega fižola (Hyten in sod., 2010; Souza in sod., 2013; Mukeshimana in sod., 2014; Trapp in sod., 2015; Hoyos-Villegas in sod., 2016). Razvoj vezanih markerjev je spodbudil študije o podobnosti genomov pomembnih stročnic (McConnell in sod., 2010). Narejene so genske karte z več kot 1000 različnimi markerji, razporejenimi v 11 vezanih skupin, ki služijo kot okvir analizam celotnega genoma, kar je velik potencial za uporabo pri študijah podobnosti in analizah QTL (Galeano in sod., 2011, 2012). Znana je skupna genska karta, ki je narejena z uporabo potomcev treh križanj različnih starševskih linij navadnega fižola (DOR364 × BAT477, DOR364 × G19833 in BAT93 × JALOE558) (Blair in sod., 2012; Cordoba in sod., 2010; Hougaard in sod., 2008; McConnell in sod., 2010). Skupna genska karta ima v 11 vezanih skupinah razporejenih 1010 markerjev, od tega je 446 SNP, 392 SSR, 99 RAPD, 45 RFLP, 22 AFLP, 5 STS molekulskih markerjev in en fenotipski marker (Galeano in sod., 2011).

Pred kratkim so Schmutz in sod. (2014) objavili referenčni genom navadnega fižola andskega genotipa G19833 (PHYTOZOME, 2014) iz zbirke CIAT (Internacionalni center tropske agrikulture, Kolumbija), ki omogoča razvoj novih tehnik selekcije sort zelenih lastnosti. Velikost genoma navadnega fižola je 521 Mb in predstavlja 89 % celotnega 587 Mb genoma (KEW, 2014). Prvi osnutek celotnega genoma navadnega fižola genotipa (BAT93) iz srednjeameriškega genskega sklada je bil prav tako narejen v okviru konzorcija PhasIbeAm (Vlasovab in sod., 2014).

Rastlinski genski material je bil za prve genske karte navadnega fižola večinoma izbran iz obeh genskih skladov, saj so predhodne raziskave pokazale, da se število polimorfizmov v tem primeru drastično poveča, kar je za kartiranje priporočljivo (Haley in sod., 1994). Z vedno več odkritimi in dostopnimi markerji ter izdelanimi genskimi kartami pa se je za kartiranje začelo uporabljati starševske linije istega genskega sklada. Kljub temu je genskih kart potomcev križancev istega genskega sklada malo, saj je v takem primeru polimorfnost markerjev zelo nizka (Frei in sod., 2005; Blair in sod., 2006, 2012). Prvo gensko karto populacije križancev andskega genskega sklada so objavili Cichy in sod. (2009) pri preučevanju prilagoditve navadnega fižola na pomanjkanje fosforja v tleh. Gensko karto populacije križancev andskega genskega sklada dolžine 1105 cM sestavlja 166 molekulskih (SSR, RAPD, AFLP) in en fenološki marker, ki so razporejeni v 11 vezanih skupin. Z uporabo šestih lastnosti (dolžina in površina korenin, vnos fosforja, učinkovitost izrabe fosforja, pridelek zrn in vsebnost fosforja v semenu) so Cichy in sod. (2009) določili 29 QTL na 8 vezanih skupinah.

2.3.1 Rekombinacije in povezanost genov

Gensko kartiranje deluje na principu razporeditve genov (markerjev ali lokusov) po kromosomski rekombinaciji med mejozo, kar omogoča analizo njihove razporeditve pri potomcih (Paterson in sod., 1996). Med mejozo se kromosomi razporedijo v gamete naključno, tako da je segregacija alelov enega gena neodvisna od alelov drugega gena (Semagn in sod., 2006). Zakon o neodvisni razporeditvi opisuje drugi Mendlov zakon. Ta velja za gene, ki se nahajajo na različnih kromosomih. Tovrstni rekombinaciji pravimo interkromosomska rekombinacija (Semagn in sod., 2006). Zanja je značilno, da oba razreda rekombinantnih osebkov zavzameta vsak po 25 % potomstva v testnem križanju (enako tudi oba starševska tipa). Zakon neodvisnega dedovanja pa ne drži vedno za gene, ki se nahajajo na istem kromosomu. Gena (oz. njune alelne kombinacije), ki se na kromosomu nahajata dovolj blizu, se razporejata v gamete odvisno eden od drugega, zato pravimo, da sta povezana (Semagn in sod., 2006). Te kombinacije alelov se bodo tudi pogostejše prenesle skupaj iz staršev na potomce, kot geni, med katerimi je razdalja večja. V profazi mejoze prihaja v jedru do parjenja homolognih kromosomov in oblikovanja tetrad. Kromatide homolognih kromosomskih parov se lahko med seboj prekrizajo – nastane tako imenovana hiazma – in zamenjajo del genetskega materiala (Semagn in sod., 2006). Rezultat prekrizanja (angl. crossing over) je nastanek novih rekombinantnih tipov kromosomov, ki so drugačni od starševskih. Tej rekombinaciji pa pravimo intrakromosomska rekombinacija in je posledica izmenjave genetskega materiala med nesestrskima homolognima kromatidama, kar se zgodi bistveno redkeje kot interkromosomska rekombinacija (Semagn in sod., 2006).

Rekombinacija med različnima lokusoma je močno povezana s fizično razdaljo med njima. Če sta gena povezana (sta na istem kromosomu), bo prišlo do rekombinacije le, če bo med njima prišlo do prekrizanja. Frekvenca je razmerje med številom rekombinantov in celotnim številom potomcev. Ker pride do rekombinacije med dvema kromatidama od štirih, bo njuna frekvenca $< 50 \%$ (Semagn in sod., 2006). Maksimalna frekvenca med dvema genoma znaša tako 50 %, kar pomeni, da gena nista povezana, saj sta tako daleč narazen, na primer vsak na svojem koncu kromosoma, da je med njima prišlo do vsaj

enega prekrižanja. Frekvenca rekombinacije (ali vrednost prekrižanja) nam poda oceno razdalje med dvema lokusoma na kromosomu, pod pogojem, da je verjetnost prekrižanja proporcionalna razdalji med lokusoma (Semagn in sod., 2006). Enoto pogostosti pojavljanja rekombinacij (ena rekombinacija na 100 mejoz) so v čast T. H. Morganu, pionirju na področju raziskav kartiranja, poimenovali centimorgan (cM). V povprečju velja ocena, da pri evkariontih 1 cM pomeni razdaljo med dvema lokusoma, ki je 1×10^6 baznih parov. Frekvenca rekombinacij, ki jo še zaznamo v poskusih, pa navadno ni nižja od 0,1–0,2 %, kar na kromosomu pomeni nekaj sto tisoč baznih parov (Čerenak in Javornik, 2008). Razmerje med gensko razdaljo (cM), določeno z genskim kartiranjem in fizično razdaljo, merjeno z baznimi pari, variira med organizmi in med kromosomi, zato je težko predvideti, kako velik segment je med genom in markerjema. Pogostost pojava rekombinacij vzdolž celotnega genoma ni popolnoma enaka, v bližini telomer je večja kot v bližini centromer, poleg tega pa obstajajo v genomu tudi območja s povečano pogostostjo prekrižanj (Čerenak in Javornik, 2008). Na rekombinacijo vpliva tudi okolje.

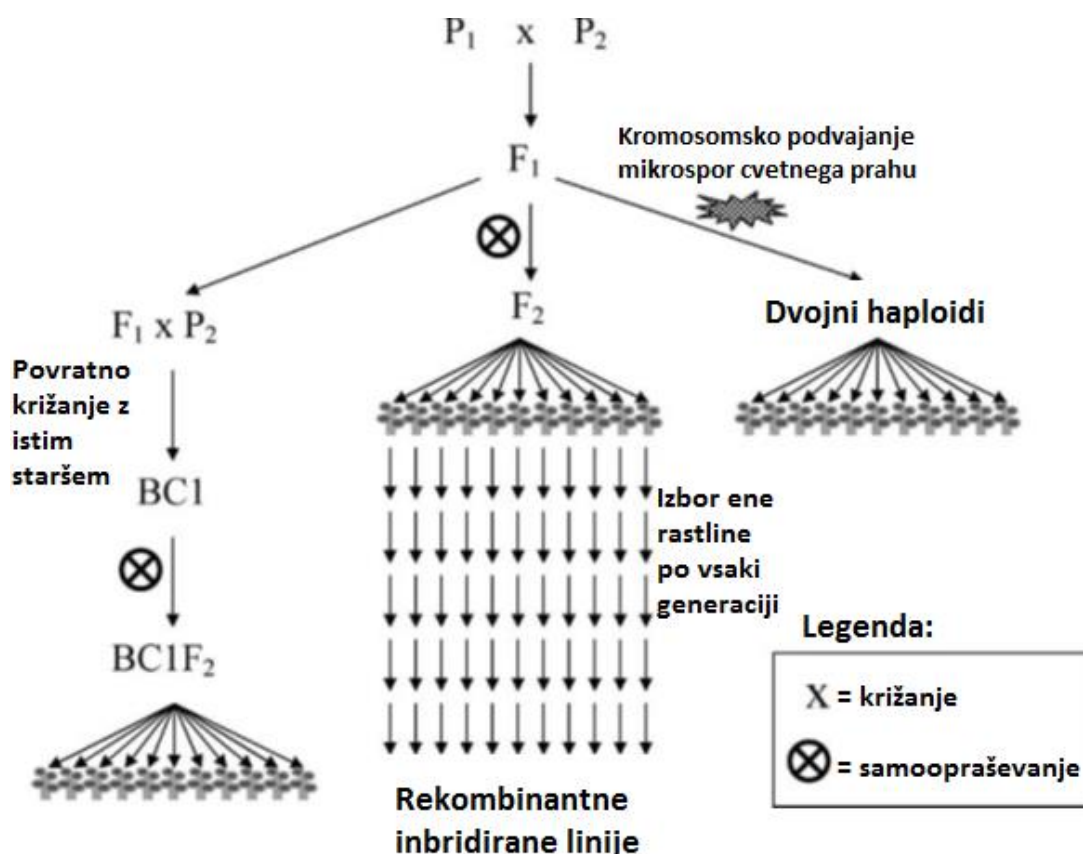
2.3.2 Izbira populacije za kartiranje

Prvi pogoj za izdelavo genske karte je izbor dveh genetsko različnih starševskih linij, ki kažeta jasne genetske razlike pri vsaj eni ali več izbranih lastnostih. Starševski liniji morata biti dovolj genetsko različni za pridobitev zadostnega števila polimorfizmov, a še vedno dovolj podobni, da ne pride do sterilnosti potomstva in/ali visoke stopnje segregacijskega odklona med analizo vezanosti (Semagn in sod., 2006). Stopnja polimorfizma odločilno vpliva na stopnjo segregacije pri potomcih. Pri samoprašnicah izhaja populacija za kartiranje iz obeh močno homozigotnih staršev oz. inbridiranih linij, pri tujeprašnicah pa je situacija bolj zapletena, saj večina takih vrst ne tolerira samoopraševanja. Zato se pri rastlinah, kjer je prisotna izrazita inbriding depresija (npr. vinska trta (*Vitis* sp.) (Fischer in sod., 2004)), samoinkompatibilnost, ali pa če proučujemo dvodomne rastlinske vrste (npr. hmelj (*Humulus lupulus* L.) (Čerenak, 2004)), poslužujemo tako imenovanega dvojnega psevdotestnega križanja. Pri tej metodi križamo zelo heterozigotna starša in na osnovi segregacijske analize F_1 -potomcev naredimo neodvisni karti za oba starševska genotipa (Grattapaglia in Sederoff, 1994).

Populacijo za kartiranje lahko pridobimo s kontroliranim ali z naravnim križanjem. Zadnje se redko uporablja pri rastlinah, pogosteje je v rabi pri humani genetiki. Kontrolirana križanja lahko izvedemo s križanjem heterozigotnih staršev (psevdotestno križanje in »offspring« križanje) ali s križanjem homozigotov, kjer gre za križanja dveh t. i. čistih linij. Glede na način križanja dveh čistih linij lahko pridobimo različne populacije (Slika 2). Izbira populacije močno vpliva na uspešnost vezanega kartiranja in je odvisna tudi od markerskega sistema, ki ga uporabljamo. Navadno se za kartiranje uporabljajo potomci F_2 -generacije, povratnih križanj (angl. BC – backcross), dihaploidi (angl. DHL – double haploide lines) ali rekombinantne inbridirane linije (RIL). Populacija potomcev F_2 -generacije je najbolj informativna predvsem z uporabo kodominantnih markerjev. Dobimo jo s samooprašitvijo hibridov F_1 -generacije, križancev dveh starševskih linij. Testiranje potomcev F_2 -generacije se pogosto uporablja pri genskem kartiranju, ko fenotip ni izražen konsistentno (npr. odpornost na bolezni), ali ko lastnost določajo QTL (kvantitativni lokusi) (Čerenak in Javornik, 2008).

Povratna križanja izvedemo s križanjem F_1 -generacije z enim od staršev (prejemni ali ponavljajoči starš). Če je selekcija s povratnim križanjem ponovljena vsaj šest generacij, več kot 99 % genoma šeste generacije ali več pripada ponavljajočemu staršu (Babu in sod., 2004). Populacije povratnih križanj so lahko uporabne za kartiranje dominantnih markerjev, če so vsi lokusi ponavljajoče se komponente homozigotni in če imata dajalec ter prejemnik nasprotne polimorfne markerje. Pri manjši zasičenosti markerjev (> 15 % rekombinacij) so populacije povratnih križanj bolj informativne v primerjavi z RIL. Povečano število rekombinacij je koristno za tesne povezave, a je lahko nezaželeno pri izdelavi kart z nizko nasičenostjo markerjev (Čerenak in Javornik, 2008). Populacije je s povratnim križanjem razmeroma lahko pridobiti, vendar pa pridobimo omejeno količino semen.

Rastline RIL dobimo s ponovljivim samoopraševanjem posamezne rastline, s čimer pričnemo v F_2 -generaciji. Metodo imenujemo spremljanje potomstva posamičnega semena (angl. SSD – single seed descent) in jo nadaljujemo do šeste oziroma osme generacije. Pri RIL so možni večkratni (multipli) testi v različnih okoljih in neomejeno vzdrževanje linij, ni medvrstne genske variance. Skupina rekombinantnih inbridiranih rastlin zagotavlja izredno uporabno populacijo za analizo vezanosti genov in izdelavo genske karte ter je enakovredna linijam dvojnih haploidov (Semagn in sod., 2007). Populacija dvojnih haploidov je narejena iz podvojevanja gamet iz F_1 - ali F_2 -generacije. Rastline so vzgojene s tehniko tkivnih kultur po kromosomski podvojitvi pelodnih zrn s pomočjo kemijskega tretiranja ali iz haploidnih zarodkov, nastalih iz vrstnega križanja. Z uporabo RIL, dvojnih haploidov ali populacij povratnih križanj (faza združevanja) zagotavljajo dominantni markerji enako količino informacij kot kodominantni markerji. Z uporabo RIL ali dvojnih haploidov so informacije, dobljene z dominantnimi markerji, najbolj informativne (Semagn in sod., 2006).



Slika 2: Potek pridobivanja glavnih tipov populacij za kartiranje samoprašnih vrst rastlin (Collard in sod., 2005).

Figure 2: Diagram of the main types of mapping populations for self-pollinating species (Collard et al., 2005).

Točnost določanja genske razdalje in zaporedje markerjev je neposredno povezano s številom posameznikov, vključenih v populacijo za kartiranje. Za izdelavo genske karte naj bi jih bilo vsaj 50 (Young, 1994). Zaželena velikost populacije za kartiranje je od 50 do 250 posameznikov (Mohan in sod., 1997), a za večjo resolucijo natančnega oz. finega kartiranja je potrebnih še več (Verma in sod., 2015).

Izbor segregirajoče populacije je najtežavnejši, drag in kritičen del procesa žlahtnjenja samoprašnih sort. Danes poznamo veliko metod (npr. razvrščanje (»bulk«), razvrščanje v F_2 -generaciji, rodovništvo, potomstvo posameznega semena (SSD)) poenostavljenih in optimiziranih z zmanjšanim stroškom uporabe za razvoj sort za žlahtnjenje (Vales in sod., 2009). V mnogih programih javnih inštitucij za razvoj sort navadnega fižola uporabljajo različne metode žlahtnjenja. Moreira in sod. (2010) so ocenili dobro uporabnost metod rodovništva, razvrščanja in potomstva posameznega semena. Razvrščanje v F_2 - in F_3 -generaciji je prav tako pogosto uporabljena metoda v žlahtniteljskih programih navadnega fižola, predvsem v Braziliji (Ramalho in sod., 2012). Izbor metode temelji na ciljih žlahtniteljskega programa, dostopnih (finančnih in fizičnih) virih, tarčni lastnosti, potrebi po ohranitvi variabilnosti skozi generacije, razvoju potomcev želenih lastnosti, učinku naravne selekcije in vzorčenju. Metode, uporabljene za selekcijo pridelka zrnja, so primerjali pri različnih vrstah rastlin (soja, navadni fižol, kitajski fižol, čičerika, ječmen,

sezam, riž), pri katerih so se v večini študij pokazale statistično značilne razlike med uporabljenimi metodami za pridobivanje potomcev oz. sort želenih lastnosti (Pontes Junior in sod., 2016). Kljub temu pa razlike med sortami z vedno večjim pridelkom niso bile več tako velike, zato je bilo treba uporabiti učinkovitejše strategije. Raposo in sod. (2000) so določili genetski potencial segregacijske populacije za pridelek semena navadnega fižola s pomočjo rodovnika, takojšnjega razvrščanja in razvrščanja v F₂- in F₃-generaciji ter SSD. Avtorji so s pomočjo ocen genetskih in fenotipskih parametrov med uporabljenimi metodami zaključili, da sta metodi SSD in takojšnje razvrščanje boljši pri generaciji linij s potencialom za visok pridelek. Rezultati so pokazali, da metodi SSD in »bulk« ostajata najučinkovitejši strategiji za vzgojo sort z večjim pridelkom semen celo v trenutnih pogojih žlahtniteljskih programov, kjer se razlike med sortami zmanjšujejo. Omenjeni metodi omogočata razvoj najobetavnejših linij in sta najmanj pod vplivom interakcij med geni in okoljem (Pontes Junior in sod., 2016).

2.3.3 Izdelava vezane genske karte

2.3.3.1 Analiza polimorfnih markerjev

Polimorfne markerje analiziramo glede na pričakovano stopnjo dedovanja (Mendlovo dedovanje) z uporabo testa prileganja (angl. Goodness-of-fit test): chi-square test (χ^2) ali test log verjetnosti (angl. log likelihood ratio test - LR).

$$\chi^2 = \sum_{j=1}^n \left[\frac{(o_j - e_j)^2}{e_j} \right] \quad \dots (1)$$

$$LR = 2 \sum_{j=1}^n o_j \ln \left(\frac{o_j}{e_j} \right) \quad \dots (2)$$

Kjer je n število genotipov, o št. opaženih in e št. pričakovanih pri stopnji prostosti $sp = n - 1$.

LR se uporablja pri analizi QTL. LR in LOD sta povezana z naslednjo enačbo:

$$LOD(r) = \frac{LR(r)}{2 \ln(10)} = 0,2172 LR(r) \quad \dots (3)$$

Za vsak dodan marker/lokus se na podlagi njegovih vezanih lastnosti in ostalih že dodanih markerjev razporedi na karto ter izračuna test prileganja.

2.3.3.2 Segregacijski odklon

Značilno odstopanje razmerja dedovanja od pričakovane stopnje po Mendlovih zakonih imenujemo segregacijski odklon. Pričakovana stopnja segregacije kodominantnih in dominantnih markerjev populacije povratnega križanja, dvojnih haploidov in RIL je 1:1; kodominantnih markerjev F₂-populacije je 1:2:1, dominantnih markerjev F₂-populacije pa 3:1. Dejavniki, ki povzročajo segregacijske odklone, so lahko genetski, fiziološki in/ali okoljski (Reflinur in sod., 2014). Odstopanja se lahko pojavijo tudi zaradi nepravilnega

uporabljenega genetskega materiala, slabe kakovosti podatkov, nenaključnega vzorčenja ali zaradi nesorazmerja gamet, ki jih dobimo največkrat pri križanjih z divjimi vrstami. Možna rešitev je izločitev vseh markerjev s $p > 0,05$ (ali $p > 0,01$) iz nadaljnjih analiz. Na segregacijski odklon vpliva veliko dejavnikov, kot so količina, stopnja polimorfnosti in genetski vplivi, letalnost prašnikov, preferenčna fertilizacija, sterilnost in kromosomska translokacija, ki močno variirajo med vrstami, križanji in med različnimi populacijami za kartiranje, uporabljenimi markerji in podobnim (Liu in sod., 2010). Segregacijski odklon vpliva na konstrukcijo vezane genske karte in na detekcijo QTL (Zhu in sod., 2007).

Razporeditev segregacijskega odklona in vpliv genetskih faktorjev na segregacijski odklon populacije kartiranja omogoča spremljanje celotnega genoma za nove odklone lokusov in njihov odnos do novo nastalih ovir (Reflinur in sod., 2014). V raziskavi Yamagishi in sod. (2010) se je izkazalo, da se regije segregacijskega odklona v F_2 -populaciji razlikujejo od regij v populaciji DH, pridobljeni iz enakega križanja. Primerjava med različnimi vrstami populacije je pokazala, da segregacijski odkloni prevladujejo v DH in RIL, v F_2 -populaciji pa jih je manj (Zhang in sod., 2010).

Segregacijske odklone lahko najdemo v različnih vrstah markerjev, tako v morfoloških, encimskih kot v molekulskih. V primerjavi z ostalimi markerji so molekularni fenotipsko neodvisni in bolj zanesljivi v analizah segregacijskega odklona. Analize molekulskih markerjev v multiplih populacijah so zato zelo uporabne za določanje segregacijskih odklonov in za nadaljnjo identifikacijo genov, ki povzročajo tovrstne odklone na teh regijah (Lu in sod., 2002).

2.3.3.3 Tvorba vezanih skupin

Markerji so razporejeni v vezane skupine – LG (angl. linkage groups) na podlagi stopnje verjetnosti. Ta je odvisna od razmerja verjetnosti, da sta dva lokusa z določeno rekombinacijsko vrednostjo povezana z verjetnostjo, da ta dva lokusa nista povezana. To razmerje označuje vrednost LOD (ang. logarithm of the odds) (Risch, 1992).

Po definiciji je vrednost LOD ($Z(\theta)$) logaritem pogostosti rekombinacij, ki jih opazujemo pri določeni frekvenci rekombinacij v primerjavi s hipotezo, da opazovani podatki predstavljajo neodvisno dedovanje ($\theta = 0,5$):

$$Z(\theta) = \log_{10} \left(\frac{L(\theta)}{L(0,5)} \right) \quad \dots (4)$$

Največkrat se v raziskavah kartiranja uporablja vrednost $\text{LOD} = 3$ kot minimalna mejna vrednost za določanje, ali sta lokusa povezana ali ne. Vrednost $\text{LOD} = 3$ pomeni, da je 1000-krat bolj verjetno, da sta lokusa povezana, kot da nista. Pri omenjeni vrednosti se izognemo pojavu lažno pozitivnih ocen (določimo povezavo, ki ne obstaja) in lažno negativnih ocen (ne zaznamo povezanosti dveh vezanih lokusov). Če testiramo multiple markerje, naraste verjetnost pojava lažno pozitivnih rezultatov, zato je treba uporabiti strožji kriterij, in sicer $Z(\theta) + \log_{10}(k)$, kjer je k število testiranih parov markerjev in $Z(\theta) \geq 3$. Pri večji mejni vrednosti LOD dobimo več razdeljenih vezanih skupin z

manjšim številom markerjev, pri manjši vrednosti LOD pa dobimo manj skupin z večjim številom markerjev na skupino. Vedno lahko na koncu dobimo tudi nekaj markerjev, ki niso dodeljeni v nobeno skupino.

Skupina vezanih markerjev je biološko gledano skupina genov, lociranih na istem kromosomu, statistično pa je to skupina lokusov, ki se pri določenih statističnih pogojih deduje skupaj. S spreminjanjem parametrov analize, izločanjem markerjev ali posameznikov in podobnim, lahko prilagajamo število vezanih skupin, vendar moramo biti pozorni, da so lahko markerji različnih kromosomov povezani naključno in da lahko dobimo markerje, razporejene v dve skupini enega kromosoma.

2.3.3.4 Funkcije genskega kartiranja

Funkcije genskega kartiranja opisujejo matematični odnos med rekombinacijsko frekvenco (r) in razdaljo na karti (x). Razdalja na karti med dvema markerjema je povprečno število rekombinacijskih dogodkov med njima na mejozo. Natančno razmerje f med r in x ($r = f(x)$) je odvisno od stopnje interference med rekombinacijskimi dogodki v sosednjih intervalih. Interferenca pomeni, da pojav prekrivanja kromosomov oz. nastanek hiazme v določeni regiji zmanjša verjetnost pojava prekrivanja v bližnjem intervalu. Če je interferenca pozitivna, pomeni, da je v sosednjih predelih rekombinacij manj, medtem ko negativna frekvenca pomeni povečano število rekombinacij v bližini. Interferenco (I) merimo s koeficientom skladnosti (C), ki izraža razmerje med opazovanim in pričakovanim dvojnem prekrivanjem ($I = 1 - C$).

Morganova funkcija kartiranja ($m = r$) določa, da je 1 % rekombinacije enak 1 enoti karte oziroma 1 cM. Razdalja na karti (m) naj bi nakazovala končno (pravo) število prekrivanj med dvema markerjema. Slabost te funkcije je, da frekvenca rekombinacije (r) meri le del rekombinacijskih dogodkov, in sicer tiste, ki se izražajo v lihih številih. Vprašljiv je tudi vpliv interference. Medlokusna razdalja je enaka frekvenci rekombinacij pri manjših razdaljah (< 10 cM), pri večjih od 10 cM to ne velja (Hartl in Jones, 2001).

Pogostost/frekvenca rekombinacije in pogostost prekrivanja nista linearno odvisni (Collard in sod., 2005), zato je treba stopnjo rekombinacije pretvoriti v centimorgan (cM). Najbolj uporabljeni funkciji za pretvorbo sta t.i. Haldanejeva, ki ne upošteva interference,

$$x_{Hal} = -\frac{\ln(1-2r)}{2} \quad \dots (5)$$

in Kosambijeva funkcija kartiranja, ki interferenco upošteva.

$$x_{Kos} = \frac{1}{4} \ln \left(\frac{1+2r}{1-2r} \right) \quad \dots (6)$$

Od teh dveh funkcij avtorji največkrat uporabljajo Kosambijevo funkcijo.

Pomembno je vedeti, da razdalje na vezani karti niso direktno povezane s fizičnimi razdaljami DNA med genskimi markerji, ampak so odvisne od velikosti genoma in vrste rastline (Paterson, 1996; Collard in sod., 2005).

2.3.3.5 Računalniški programi za gensko kartiranje

Za analize vezanosti in kartiranje se uporablja različne računalniške programe. Najpogostejše raziskovalci uporabljajo JoinMap (Stam, 1993; Ooijen, 2006), MapMaker/EXP (Lincoln in sod., 1993), GMENDEL (Echt in sod., 1992); LINKAGE (Suiter in sod., 1983) in MapManager QTX (Manly in sod., 2001), IciMapping. JoinMap je tržni program, vsi ostali naštetni so prosto dostopni.

Statistični programi za izračun zaporedja markerjev uporabljajo kriterije, kot so metoda najmanjših kvadratov, maksimalna verjetnost (angl. likelihood), minimalna vsota sosednjih rekombinacijskih delov.

Z večanjem števila markerjev se zvišuje tudi možni vrstni red, saj je za n -markerjev možnih $n!/2$ -različnih razporeditev. Za preverjanje najverjetnejše razporeditve markerjev se uporablja izračun logaritma verjetnosti. Pri tej metodi primerjamo verjetnost za možnosti vrstnega reda in izberemo najverjetnejšega.

2.4 ANALIZA QTL

Osnova analize kvantitativnih lokusov – QTL (angl. quantitative trait loci) je najti povezavo med molekulskim markerjem in določeno kvantitativno lastnostjo. Z markerji razporedimo populacijo kartiranja v različne genotipske skupine na osnovi prisotnosti ali odsotnosti določenega lokusa in določimo, ali so med skupinami značilne statistične razlike glede na izmerjeno lastnost. Bližje kot je marker kvantitativnemu lokusu, manjša je verjetnost pojava rekombinacije med njima. Zato sta po navadi marker in QTL dedovana skupaj in se bo srednja vrednost skupine močno vezanih markerjev značilno razlikovala ($p < 0,05$) od srednje vrednosti skupine brez markerja. Kadar je marker slabo vezan ali ni vezan s QTL, je njuno dedovanje neodvisno.

Da na gensko karto umestimo gen, ki vpliva na določeno kvantitativno lastnost, mora obstajati v populaciji za kartiranje fenotipska variacija lastnosti, ki jo kontrolira ta gen. Večina kvantitativnih lastnosti ni monogenih, ampak nanje vpliva več genov. Prispevek teh genov je majhen. Vsak vplivni faktor lahko označimo kot samostojni genski lokus.

Fenotip kvantitativne lastnosti je izražen kot vsota genotipa in okolja.

$$y_i = \mu + a_i + e_i \quad \dots (7)$$

Kjer je y_i vrednost kvantitativne lastnosti merjena na osebkcu i , μ je srednja vrednost populacije, a_i je vpliv genotipa in e_i vpliv okolja.

Na genski in molekularni ravni je bilo na sušnem stresu pri stročnicah ogromno raziskav narejenih z analizami QTL oziroma tehnikami odkrivanja genov z vezanimi in asociacijskimi kartami. Največ tovrstnih raziskav je bilo narejenih na soji (Charlson in sod., 2009; Du in sod., 2009) in trnati meteljki (Badri in sod., 2011; Vandecasteele in sod., 2011). Du in sod. (2009) so populacijo rekombinantnih inbridiranih linij pridobljeno s križanjem dveh starševskih linij soje, različno tolerantnih na sušni stres: sorto Kefeng1, ki je tolerantna na sušo, in sorto Nannong1138-2, ki je občutljiva na sušo, uporabili za vrednotenje različnih lastnosti, povezanih z odpornostjo na sušo. Vrednotili so kontrolne rastline in rastline, izpostavljene suši v poskusih na polju in v rastlinjaku. Določili so 40 QTL-regij, od tega 17 za lastnost vsebnosti vode v listih v sušnem stresu in 23 za pridelek zrnja kontrolnih rastlin ter rastlin, izpostavljenih suši, tako pri poskusih na polju kot tudi v rastlinjaku. Te raziskave niso samo pojasnile genetske osnove tolerance na sušo, ampak so priskrbele zanesljive QTL-regije za uporabo v žlahtnjenju s pomočjo markerjev za pridobitev rodovitnejših sort soje z večjo toleranco na sušni stres (Scaboo in sod., 2009; Fallen in sod., 2013).

Znane so QTL-regije, ki so razpršene po celotnem genomu navadnega fižola, izpostavljenem različnim rastnim razmeram, in so povezane z morfološkimi lastnostmi (Koinange in sod., 1996; Tar'an in sod., 2002; Beattie in sod., 2003; Blair in sod., 2006; Perez-Vega in sod., 2010) s pridelkom (Park in sod., 2000; Tar'an in sod., 2002; Blair in sod., 2006), rastlinsko in koreninsko arhitekturo rasti (Pérez-Vega in sod., 2010; Silva in sod., 2013), z vsebnostjo hranil (Blair in sod., 2010) in s časom kuhanja zrnja (Garcia in sod., 2012).

Velik napredek je bil dosežen tudi z raziskavami na odpornosti na bolezni in škodljivce (Miklas in sod., 2006). Markerji, vezani s QTL-regijami za odpornost na biotske dejavnike, so bili karakterizirani in uporabljeni neposredno v selekciji (Ender in sod., 2008), ali pa so bili pretvorjeni v karakterizirane sekvence pomnoženih regij (SCAR), ki so se v praksi izkazale za uporabne pri razvoju linij oziroma sort navadnega fižola s povečano odpornostjo na bolezni (Kelly in sod., 2003).

Kljub temu, da je bilo narejenih že veliko vezanih kart z znanimi QTL-regijami, je le nekaj QTL-regij vezanih z isto lastnostjo. Vzrok temu je lahko reducirana velikost segregacijske populacije, uporaba različnih generacij, genske interakcije predhodnikov, $G \times E$ interakcije in omejitve pri delni primerjavi vezanih skupin med različnimi študijami (Pereira Vianello in Brondani, 2014).

2.4.1 Statistične metode analize QTL

2.4.1.1 Vezanost posameznega markerja s QTL

Analiza vezanosti posameznega markerja – SIM (angl. single-marker analysis) je najosnovnejša metoda za detekcijo QTL povezanih z enim markerjem. Metoda uporablja statistične analize, kot so t-test, analiza variance (ANOVA) in linearna regresija. Najpogosteje se uporablja analizo linearne regresije, saj koeficient determinacije (R^2) markerja razloži fenotipsko varianco, ki izhaja iz povezave QTL z markerjem. Celotna genska karta za to metodo ni potrebna in lahko jo uporabljamo že s preprostimi osnovnimi software programi. Slabost te metode: bolj kot je QTL oddaljen od markerja, slabše ga je prepoznati, kar je posledica rekombinacij med njima. Metoda samo določa QTL, ne njegove lokacije. Problem lahko zmanjšamo z večjim številom markerjev oz. večjo pokritostjo genoma z markerji, po navadi na intervalu < 15 cM (Tanksley, 1993).

QTL je vezan z markerjem M z rekombinacijsko frekvenco r . QTL vpliva na kvantitativno lastnost in vrednost lastnosti osebkov i lahko zapišemo:

$$y_i = \mu + f(M_i) + e_i \quad \dots (8)$$

Kjer je $f(M_i)$ opredeljena funkcija lastnosti markerja.

2.4.1.2 Intervalno kartiranje

Metoda intervalnega kartiranja – SIM (angl. simple interval mapping) je osnovana na principu, da je QTL lociran med dvema sosednjima markerjema (Lander in Botstein, 1989). Markerja sta povezana z rekombinacijsko frekvenco r . Razmerje rekombinacijskih frekvenc ob upoštevanju interference je:

$$r = r_1 + r_2 - 2r_1r_2 \quad \dots (9)$$

Če je r majhna (markerja sta tesno vezana), se predvideva, da ni dvojnih prekržanih kromatid in ni interference, zato sledi:

$$r \approx r_1 + r_2 \quad \dots (10)$$

Pri intervalnem kartiranju sta možna dva pristopa, in sicer verjetnostni ali regresijski pristop. Pozicija QTL je odvisna od celotnega intervala med markerjema in je v primerjavi z metodo vezanosti posameznega markerja statistično močnejša.

S to metodo ne moremo določiti, koliko kvantitativnih lokusov je v enem segmentu, poleg tega pa na rezultate lahko vplivajo bližnji QTL v sosednjih regijah kromosomov. Vzrok tega so lahko vezani QTL, interakcije QTL in/ali nizka informativnost podatkov. Zato težje določimo mesto QTL, saj je vrh krivulje relativno nizek in širok.

2.4.1.3 Kompozitno intervalno kartiranje

V zadnjem času se pri kartiranju QTL vedno pogosteje uporablja kompozitno intervalno kartiranje – CIM (angl. composite interval mapping), ki je kombinacija enostavnega intervalnega kartiranja in linearne regresije (Zeng, 1994; Jansen in Stam, 1994). Analiza v statistični model, poleg sosednjega para povezanih markerjev, vključi dodatne markerje za intervalno kartiranje. Glavna prednost metode CIM je večja natančnost in učinkovitost pri kartiranju QTL v primerjavi z metodama SMA in SIM, predvsem kadar so vključeni vezani QTL (Collard in sod., 2005).

2.4.1.4 Računalniški programi za kartiranje QTL

Za analizo QTL je na razpolago več statističnih računalniških programov. Najpogosteje se uporabljata Windows QTL Cartographer (Wang in sod., 2012) in MapQTL (Ooijev, 2004).

2.5 ALTERNATIVNE METODE KARTIRANJA QTL

Konstrukcija vezane karte in analiza QTL zahteva ogromno časa, napora ter denarnih sredstev. Zato obstajajo alternativne metode, s katerimi lahko prihranimo čas in denar, kar je zelo uporabno pri omejeni količini razpoložljivih virov. Metodi, ki se ju uporablja za identifikacijo markerjev, vezanih s QTL, poleg kartiranja QTL, sta segregacijska analiza – BSA (angl. bulk segregant analysis) in selektivna genotipizacija. Obe zahtevata populacijo kartiranja.

BSA je metoda, ki jo uporabljamo za detekcijo markerjev, lociranih na določenih regijah kromosomov (Michelmore in sod. 1991). Dva pola/skupini vzorcev DNA sestavlja 10–20 individualnih rastlin segregacijske populacije in se razlikujeta v lastnosti, ki nas zanima (npr. toleranca na sušo, odpornosti na določeno bolezen ...). Pri razvrščanju vzorcev DNA v skupine so aleli razporejeni naključno, razen regije, ki vsebuje gen, ki nas zanima. Z markerji analiziramo obe skupini vzorcev DNA. Polimorfni markerji predstavljajo

markerje, ki so povezani z genom ali z želenim QTL. Ko je celotna populacija testirana s polimorfnimi markerji, lahko konstruiramo lokacijsko vezano karto. Ta nam omogoča analizo QTL in determinacijo QTL (Ford in sod., 1999). BSA se v osnovi uporablja za določanje genov, ki kontrolirajo enostavnejše lastnosti, kljub temu pa se lahko uporablja tudi za identifikacijo markerjev, vezanih na »major« QTL; QTL, povezane z več geni (Wang & Peterson, 1994). Za generacijo multiplih markerjev iz posameznega vzorčenja DNA se najpogosteje uporabljata markerska sistema RAPD in AFLP z velikim končnim izkupičkom (Collard in sod., 2005).

Selektivna genotipizacija temelji na izboru posameznikov iz populacije, ki predstavlja fenotipski ekstrem analizirane lastnosti (Zhang in sod., 2003). Konstrukcija vezane karte in analiza QTL je tako narejena samo na individuumih z ekstremnim fenotipom. Genotipizacija podzorca populacije lahko močno zmanjša ceno študije kartiranja. Tipično se to tehniko uporablja predvsem takrat, ko je vzgoja in fenotipizacija rastlin kartirane populacije lažje izvedljiva in/ali cenejša od genotipizacije z uporabo markerjev DNA. Slaba stran te metode je, da ni učinkovita pri določanju učinkov QTL in da na enkrat lahko testiramo samo eno lastnost (Tanksley, 1993). Prav tako uporaba enosmerne analize za detekcijo QTL pri tej tehniki ni primerna, saj bi bili tako učinki fenotipa precenjeni; primernejša je uporaba intervalnega kartiranja (Lander & Botstein, 1989).

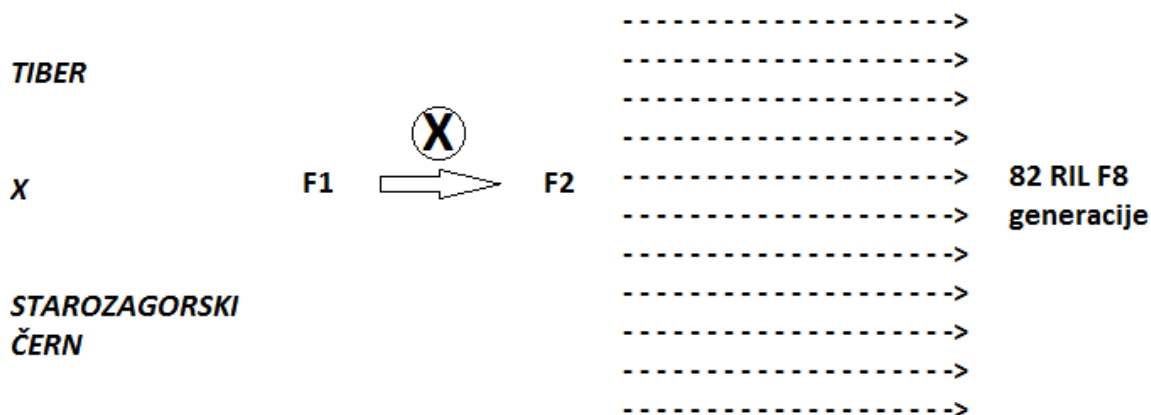
V zadnjem času se je močno razvila tehnika asociacijskega kartiranja (angl. GWAS – genome wide association studies), ki je alternativa klasičnemu biparentalnemu kartiranju QTL za identifikacijo genetskih osnov kvantitativnih lastnosti (Rafalski, 2010).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

V raziskavi smo uporabili dve sorti navadnega fižola, ki se razlikujeta v toleranci na sušo. Sorta 'Tiber', ki izhaja iz Francije (Clause Semences), se je na podlagi predhodnih raziskav različnih sort navadnega fižola izkazala za bolj tolerantno, sorta 'Starozagorski čern' ('Starozagorski') (Semenarna Ljubljana, Slovenija) pa kot najmanj tolerantna na sušo. Sorta 'Tiber' je imela kasnejši in manjši padec vodnega potenciala v suši ter največjo integriteto celične membrane po tretiranju s polietilenglikolom (PEG) v primerjavi s sortama 'Zorin' in 'Starozagorski' (Hieng in sod., 2004). Najmanjša toleranca na sušni stres med vsemi tremi sortami se je pri sorti 'Starozagorski' pokazala tudi v hitrem zmanjšanju potencialne fotokemične učinkovitosti v sušnem stresu (Razinger in sod., 2010). Obe sorti, 'Tiber' in 'Starozagorski', sta grmičaste rasti in namenjeni pridelavi stročja. Obe izhajata iz andskega genskega sklada (Maras, 2007; Šuštar-Vozlič in sod., 2012).

Izbrani sorti sta bili uporabljeni kot starševski liniji za pridobitev populacije za kartiranje lokusov kvantitativnih lastnosti (QTL) (Zupin in sod., 2014; Šuštar-Vozlič in sod., 2015). Vzgoja rastlin je potekala v rastlinjaku na Kmetijskem inštitutu Slovenije (KIS) ter na poskusnem polju Jablje pri Trzinu, kar nam je omogočilo letni napredek za dve generaciji v letih 2007–2011. S križanjem sorte 'Tiber' in sorte 'Starozagorski' smo pridobili F₁-generacijo, ki smo jo samooprašili, in tako pridobili F₂-generacijo. Sledila je samooplodna osebkov F₂-generacije z metodo »selekcije potomstva posameznega semena« – SSD (angl. single seed descent) (Slika 3).



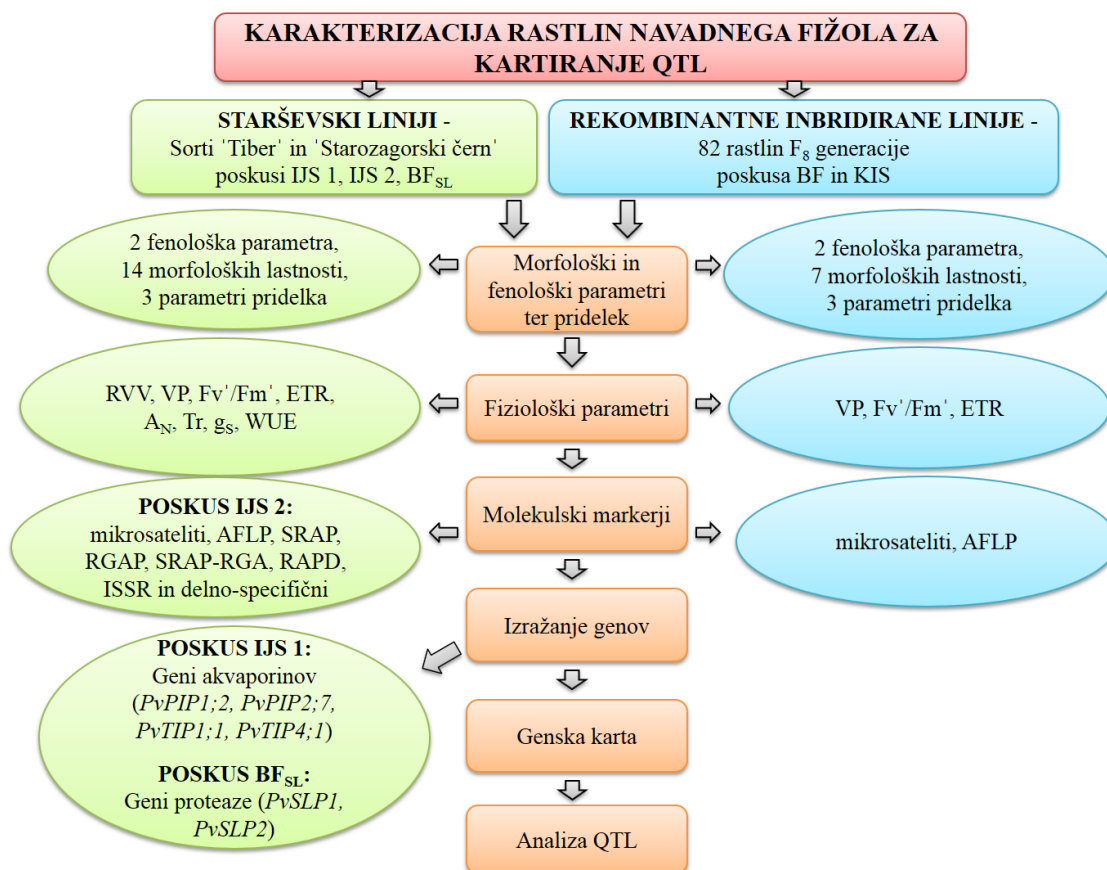
Slika 3: Postopek pridobitve populacije 82 rekombinantnih inbridiranih linij F₈-generacije za kartiranje lokusov kvantitativnih lastnosti.

Figure 3: The process of obtaining the population of 82 recombinant inbred lines of F₈-generation for mapping of quantitative trait loci.

Pri metodi SSD so od vsake rastline posadili eno seme in dve za rezervo, za primere, kjer bi lahko ostali brez semena naslednje generacije. Postopek so ponavljali vse do F₈-generacije in pridobili 82 rastlin rekombinantnih inbridiranih linij (RIL) z veliko

uniformnostjo posameznih rastlin RIL in veliko raznolikostjo med njimi. Semena posameznih generacij so bila shranili v hladilnico pri 4 °C.

Na sliki 4 je prikazana shema poteka dela meritev, vzorčenja in analiz populacije za kartiranje QTL.



Slika 4: Shema karakterizacije populacije za kartiranje QTL.

Figure 4: Scheme of characterization of QTL mapping population.

3.2 PRIPRAVA RASTLINSKEGA MATERIALA ZA VREDNOTENJE

3.2.1 Vzgoja rastlin starševskih linij

Poskus za karakterizacijo starševskih linij ('Tiber', 'Starozagorski') je potekal v rastni komori Inštituta »Jožef Stefan« (IJS) na Odseku za biotehnologijo v Ljubljani (Slika 5). V preliminarnem poskusu smo spremljali rastline v suši in določili dneve vzorčenja na podlagi vsebnosti vode v substratu in vodnega potenciala v rastlini. Nato smo izvedli še poskusa (IJS 1 in IJS 2), kjer smo rastline gojili in vzorčili po postopku, opisanem v nadaljevanju. Semena fižola smo površinsko sterilizirali s 5% natrijevim hipokloritom (Kemika, Hrvaška), jih dobro sprali s sterilno destilirano vodo in jih dve uri pustili v sterilni destilirani vodi, da so nabrekli. Nabrekla semena smo kalili tri dni v temi, pri

temperaturi 26–28 °C, v steriliziranih petrijevkah, v katere smo na plast bombažne vate položili filter papir in navlažili z destilirano vodo. Zdrava, enako nakaljena semena, smo posadili v plastične lončke premera 10 cm, napolnjene s komercialnim substratom (Potgrond P, Klasmann-Deilmann, Nemčija) in Agra-vermikulit (Pšeno, d. o. o, Hrvaška), v razmerju 1 : 1 (v/v). Rastline smo gojili v rastni komori v naslednjih razmerah: dnevna temperatura komore je bila 25–27 °C, nočna 19–21 °C, dolžina dneva 16 h in jakost svetlobe 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. Relativna vlažnost zraka je znašala na začetku poskusa $70 \pm 2 \%$, med sušo pa $50 \pm 2 \%$.

Za vsako sorto smo posadili 60 rastlin (eno seme na lonec) in po petih dneh rasti za vsako sorto izbrali 27 najbolj izenačenih rastlin za nadaljevanje poskusa. Vsako obravnavanje je imelo tri ponovitve vzorcev. Rastline smo dnevno zalivali do enake mase lonca. Po 20 dneh rasti smo rastline, namenjene suši in rehidraciji, prenehali zalivati in jih tako izpostavili sušnemu stresu, kontrolne rastline pa smo skozi celoten poskus zalivali do 70 vol% vlažnosti substrata. Med poskusom smo rastline 3-krat poškropili s fitofarmaceutskim pripravkom Vertimec Pro (Syngenta Agro, d. o. o, Slovenija) proti pršicam in Actara 25 WG (Syngenta Agro, d. o. o, Slovenija) proti beli muhi: po navodilih proizvajalca v dveh tedenskih intervalih.



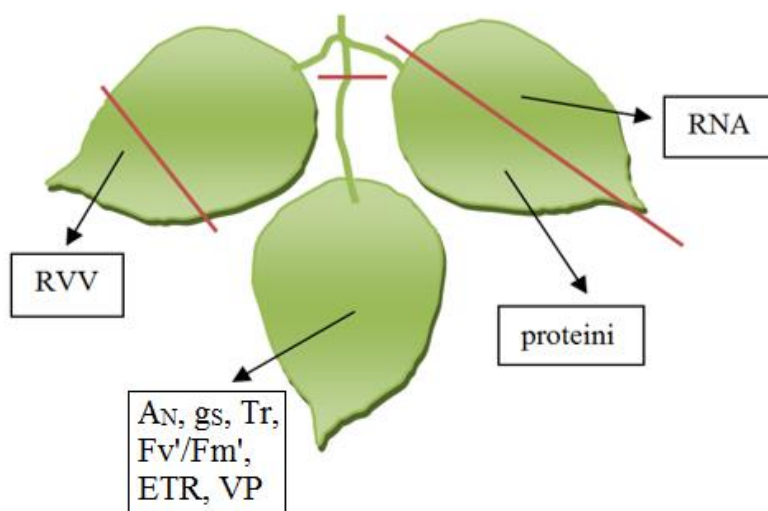
Slika 5: Poskus karakterizacije navadnega fižola sorte 'Tiber' in sorte 'Starozagorski črn' v rastni komori na Inštitutu »Jožef Stefan« v času pred cvetenjem.

Figure 5: Characterization experiment of common bean cultivars 'Tiber' and 'Starozagorski črn' in growth chamber at »Jožef Stefan« institute before flowering.

Enako kot poskuse v rastni komori na IJS, smo izvedli tudi poskuse karakterizacije starševskih linij v rastlinjaku na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani (BF) v kontroliranih razmerah (BF_{SL}). Razlika je bila ta, da smo 5 rastlin vsakega obravnavanja posadili v 7,5 l lonce v treh ponovitvah in jih po petih dneh rasti razredčili na tri najbolj

izenačene rastline. Prav tako smo rastline, namenjene suši in rehidraciji, po 20 dneh rasti prenehali zalivati, kontrolne rastline pa smo skozi celoten poskus zalivali do 70 vol% vlažnosti substrata. Rastline smo preventivno zaščitili s fitofarmaceutskima pripravkoma, kot je bilo že opisano.

V vseh omenjenih poskusih smo pri sorti 'Tiber' in sorti 'Starozagorski' spremljali kvalitativne morfološke lastnosti in vrednotili kvantitativne fenološke ter fiziološke parametre, da bi pridobili čim več podatkov o lastnostih, ki razlikujejo izbrani starševski liniji in bi nam služili za karakterizacijo populacije potomcev. Meritve in vzorčenja rastlin smo opravili v štirih različnih dneh suše na listih tretjega (šteto od spodaj navzgor) polno razvitega sestavljenega lista (Slika 6), glede na objavljene podatke vodnega potenciala (VP) pri Hieng in sod. (2004) (Preglednica 1). Na srednjem lističu smo merili netofotosintezo (A_N), prevodnost listnih rež (g_s), transpiracijo (Tr), potencialno fotokemično učinkovitost (F_v'/F_m'), hitrost transporta elektronov (ETR) in VP. En stranski prilist smo uporabili za merjenje relativne vsebnosti vode v listih (RVV), drugega pa smo vzorčili za nadaljnje laboratorijske analize za izolacijo RNA in proteinov.



Slika 6: Načrt meritev in vzorčenja tretjih popolnoma razvitih sestavljenih listov rastlin navadnega fižola sorte 'Tiber' in 'Starozagorski čern'. RVV – relativna vsebnost vode v listih, A_N – netofotosinteza, g_s – prevodnost listnih rež, Tr – transpiracija, F_v'/F_m' – potencialna fotokemična učinkovitost, ETR – hitrost transporta elektronov, VP – vodni potencial, RNA – ribonukleinska kislina.

Figure 6: Scheme of measurements and sampling of third fully grown trifoliate leaves of common bean cultivars 'Tiber' and 'Starozagorski čern'. RVV – relative water content in leaves, A_N – neto-photosynthesis, g_s – conductivity, Tr – transpiration, F_v'/F_m' – potential photochemical efficiency, ETR – electron transport rate, VP – water potential, RNA – ribonucleic acid.

Skozi celoten poskus smo vse lonce vsakodnevno tehtali in spremljali vsebnost vode v substratu (VVS). Prve meritve in vzorčenja smo v poskusih IJS 1 in IJS 2 opravili dan pred prenehanjem zalivanja (S_0), ko so bile še vse rastline zalite do 70 vol% vlažnosti substrata pri $VP_{S_0} > -0,5$ MPa. Pri poskusu BF_{SL} nismo opravili meritev in vzorčenja pred sušo. Druge smo v vseh treh poskusih opravili v suši 1 (S_1) pri $VP_{S_1} = -0,5 - -1,0$ MPa, tretje v suši 2 (S_2) pri $VP_{S_2} = -1,5 - -2,0$ MPa in četrte v suši 3 (S_3) pri $VP_{S_3} < -2,5$ MPa. Rastline, namenjene rehidraciji (RE), smo po tretjem vzorčenju (S_2) ponovno zalili in jih merili ter vzorčili 11. dan od začetka suše (S_3), da bi ocenili (z)možnost povrnitve rastlin

fižola v stanje pred stresom. Vzorce listov za izolacijo DNA smo navlažili, zavili v papirnate brisače in PVC-vrečke ter jih do uporabe shranili v hladilnik pri 4 °C. Vzorce listov za izolacijo RNA in proteaze smo takoj po vzorčenju zamrznili v tekočem dušiku in jih shranili pri -80 °C.

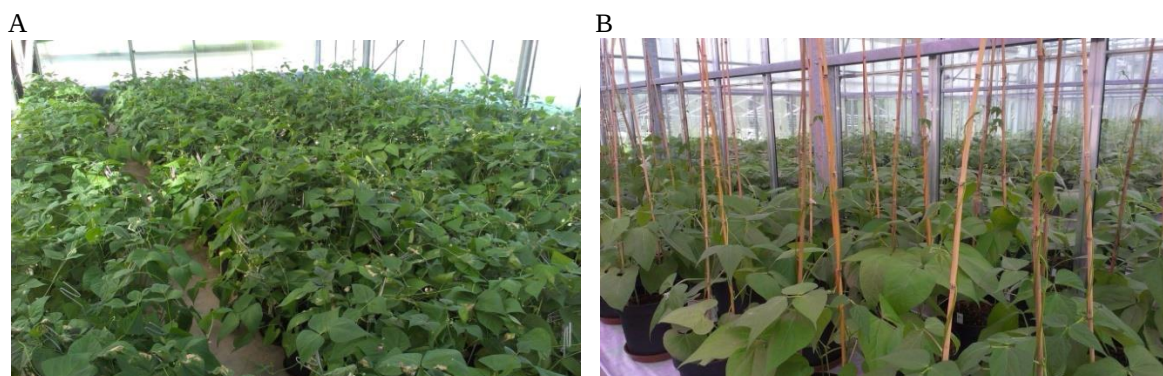
Preglednica 1: Plan meritev in vzorčenja rastlin navadnega fižola za karakterizacijo sorte 'Tiber' in sorte 'Starozagorski črn' v poskusih v rastni komori na Inštitutu »Jožef Stefan« ter v rastlinjaku na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. »*« – meritve in vzorčenja izvedena že v sušnem stresu.

Table 1: The plan of measurements and sampling of common bean plants for characterization of 'Tiber' and 'Starozagorski črn' cultivars in experiments in a growth chamber at the »Jožef Stefan« Institute and in a greenhouse at Biotechnical faculty in Ljubljana. »*« – measurements and sampling already in drought stress.

		Dnevi meritev in vzorčenja							
		Suša 0		Suša 1		Suša 2		Suša 3 oz. rehidracija	
Poskus	Obravnavanje	Št. dni v suši	Št. rastlin	Št. dni v suši	Št. rastlin	Št. dni v suši	Št. rastlin	Št. dni v suši	Št. rastlin
IJS 1	Kontrola	0. dan	3	5. dan	3	9. dan	3	11. dan	3
	Suša	0. dan	3	5. dan	3	9. dan	3	11. dan	3
	Rehidracija	0. dan		5. dan		9. dan		11. dan	3
IJS 2	Kontrola	0. dan	3	4. dan	3	7. dan	3	11. dan	3
	Suša	0. dan	3	4. dan	3	7. dan	3	11. dan	3
	Rehidracija	0. dan		4. dan		7. dan		11. dan	3
BF _{SL}	Kontrola	4. dan*	3	10. dan	3	24. dan	3	38. dan	3
	Suša	4. dan*	3	10. dan	3	24. dan	3	38. dan	3
	Rehidracija							38. dan	3

3.2.2 Vzgoja rastlin rekombinantnih inbridiranih linij

Rastline 82 rekombinantnih inbridiranih linij (RIL) navadnega fižola F₈-generacije smo okarakterizirali v dveh poskusih na različnih lokacijah. V letu 2013 smo rastline gojili v rastlinjaku na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani (BF), v letu 2014 pa v rastlinjaku na Kmetijskem inštitutu Slovenije (KIS) (Slika 7). Poskusa sta bila izvedena v naslednjih kontroliranih razmerah: dnevna temperatura v rastlinjaku je bila 26–28 °C, nočna 20–22 °C, dolžina dneva 16 h in jakost svetlobe 500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Relativna zračna vlaga je znašala $60 \pm 5\%$. Semena RIL smo površinsko sterilizirali s 5 % natrijevim hipokloritom (Kemika, Hrvaška) in jih posadili v 7,5 l lonce z enako težo substrata z mešanico, kakršno smo uporabili v poskusih z rastlinami starševskih linij. Za vsak RIL smo v tri lonce posadili po pet semen in jih ob oblikovanju prvega sestavljenega lista (5. dan rasti) razredčili na tri najbolj izenačene rastline. Rastline smo redno zalivali do 70 % vsebnosti vode v substratu, do treh tednov (21 dni), potem smo z zalivanjem prenehali in fižol tako izpostavili suši. Prav tako smo v treh ponovitvah posadili starševski liniji, pri katerih smo imeli tako rastline v suši kot vsakodnevno zalivane, kontrolne rastline (70 vol% vlage v substratu).



Slika 7: Poskus karakterizacije 82 rekombinantnih inbridiranih linij F_8 -generacije v rastlinjaku na BF (A) in KIS (B).

Figure 7: Characterization experiment of 82 recombinant inbred lines of F_8 -generation at greenhouse at BF (A) and (B).

Pri rastlinah RIL smo vrednotili morfološke, fenološke in fiziološke parametre, v katerih sta se starševski liniji razlikovali, in količino pridelka z namenom, da bi pridobili čim več podatkov različnih kvantitativnih lastnosti, potrebnih za kartiranje QTL. Meritve in vzorčenja rastlin RIL smo opravili v štirih različnih dneh suše, pri enaki vsebnosti vode v substratu kot pri poskusu z rastlinami starševskih linij, v obeh poskusih (BF, KIS) na listih tretjega (šteto od spodaj navzgor) polno razvitega sestavljenega lista (Preglednica 2). Prvo meritev smo opravili dan pred prenehanjem zalivanja (S_0), ko so bile še vse rastline zalite do 70 vol% vlažnosti substrata. Drugo meritev smo opravili v suši 1 (S_1) in tretjo v suši 2 (S_2). Rastline RIL smo po S_2 začeli ponovno zalivati do končnega pridelka. Vzorce listov za izolacijo DNA smo navlažili, zavili v papirnate brisače in PVC-vrečke ter jih shranili v hladilnik pri 4 °C. Za biotično varstvo smo RIL 3-krat poškropili s fitofarmacevtskima pripravkoma Vertimec Pro in Actara 25 WG po navodilih proizvajalca: v dveh tedenskih intervalih.

Preglednica 2: Plan meritev in vzorčenja rastlin RIL navadnega fižola v dveh poskusih v rastlinjaku na Biotehniški fakulteti in Kmetijskem inštitutu Slovenije.

Table 2: Plan of measurements and sampling of common bean RILs in two experiments in greenhouses at the Biotechnical faculty and at the Agricultural institute of Slovenia.

Poskus	Obr.	Stopnja suše					
		Suša 0		Suša 1		Suša 2	
		Št. dni v suši	Št. rastlin	Št. dni v suši	Št. rastlin	Št. dni v suši	Št. rastlin
BF	Suša	0. dan	3 × 3	10. dan	3 × 3	23. dan	3 × 3
KIS	Suša	0. dan	3 × 3	13. dan	3 × 3	17. dan	3 × 3

3.3 METODE

3.3.1 Merjenje vsebnosti vode v substratu

Pred pripravo poskusa smo določili zadrževalno (»poljsko«) kapaciteto vode substrata (VVS). V 10 cm³ cilindru smo najprej stehali svežo maso (m_{S-1}), po 24 urah namakanja pa nasičeno maso substrata (m_{S-nas}). Po 24 urah sušenja pri 70 °C smo dobili suho maso (m_{S-2}). S pridobljenimi podatki smo izračunali zadrževalno kapaciteto vode substrata po naslednji enačbi:

$$VVS (vol. \%) = \left[\left(\frac{m_{S-1} - m_{S-2}}{m_{S-nas} - m_{S-2}} \right) \times 100 \right] \rho_{substrata} \quad \dots (11)$$

Lonce smo napolnili z enako količino substrata in jih zalili do 70 vol%. Med poskusom smo jih vsakodnevno tehtali in spremljali vlažnost substrata. S tem smo v vzorcih kontrolirali stopnjo suše.

3.3.2 Meritve fizioloških parametrov

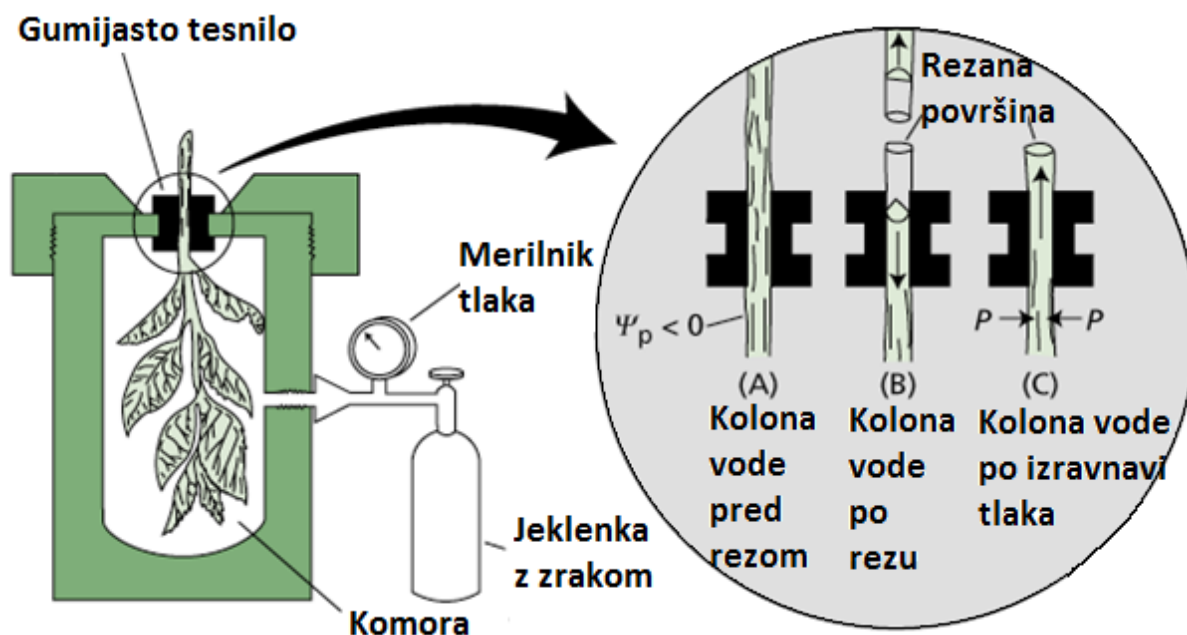
3.3.2.1 Relativna vsebnost vode v listih

Vodni status rastline smo določili z relativno vsebnostjo vode v listih (RVV) rastlin starševskih linij. Vzorčili smo zgornji listič stranskega sestavljenega lista v treh ponovitvah. Takoj po odvzemu smo ga zaprli v stekleni tehtič z znano maso in ga skupaj z listom še enkrat stehali, da smo dobili svežo maso lista (m_{L-1}). Nato smo list položili v plastično petrijevko na filter papir, ki smo ga predhodno namočili z destilirano vodo. Po 24 urah, ko je bil list nasičen z vodo, smo ga ponovno zaprli v tehtič in določili nasičeno maso lista (m_{L-nas}). Po 24 urah v sušilniku na 90 °C smo določili še suho maso (m_{L-2}) vzorca lista. RVV smo izračunali po enačbi:

$$RVV (\%) = \left(\frac{m_{L-1} - m_{L-2}}{m_{L-nas} - m_{L-2}} \right) \times 100 \quad \dots (12)$$

3.3.2.2 Vodni potencial

Vodni potencial rastline smo izmerili v listih starševskih linij in RIL s pomočjo Scholanderjeve tlačne komore (chamber 3005-1223, Soil moisture Equioment Corp., Goleta, ZDA) po navodilih Scholanderja in sod. (1964). Vzorčili smo sredinski sestavljen list starševskih linij in RIL v treh ponovitvah.

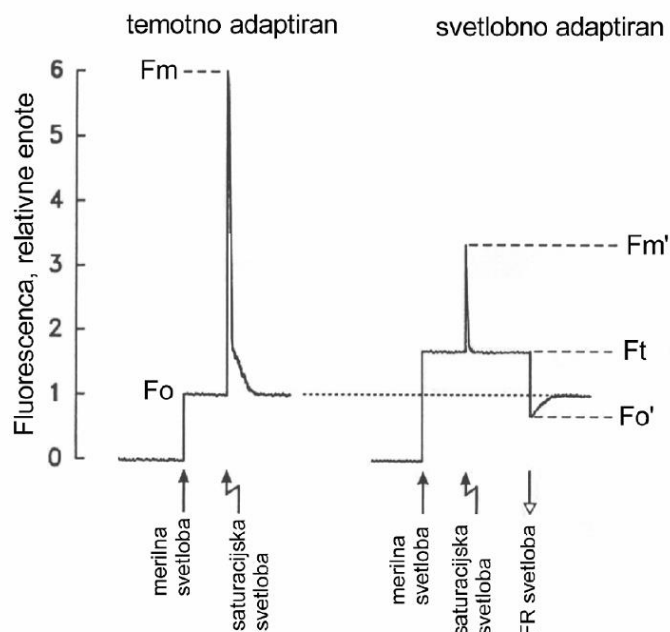


Slika 8: Princip delovanja Scholanderjeve tlačne komore.
Figure 8: Princip of the Scholander pressure chamber measurement.

Slika 8 podrobneje prikazuje postopek merjenja vodnega potenciala s Scholanderjevo tlačno komoro. Diagram na levi prikazuje poganjek zapečaten v komoro, ki je lahko stisnjen s plinom. Skica na desni kaže stanje stolpca vode v ksilemu: A) ksilem je nerazrezan in pod negativnim pritiskom ali napetostjo, B) poganjek razrežemo, vodo povleče nazaj v tkivo, proč od prereza, kot odziv na napetosti v ksilema, C) komora je pod tlakom, tako sok ksilema pride znova na površino prereza.

3.3.2.3 Fluorescenca klorofila

Fluorescenca klorofila smo izmerili s pomočjo fotosinteznega mini PAM (»pulse amplitude modulated«) analiznega fluorometra (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Nemčija) na listih starševskih linij in RIL. Maksimalni fotokemični kvantni izkoristek fotosistema II oz. potencialno fotokemično učinkovitost ($PSII = Yield = (F_m - F_0)/F_m = \Delta F/F_m$) smo določili s predhodno 10-minutno zatemnitvijo lista s priloženo sponko. Tako smo pridobili F_0 . Za nasičenje $PSII$ (F_m) smo uporabili 0,8 sekund dolg pulz s $616 \mu\text{mol}$ fotosintezne aktivne radiacije $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Parameter stabilnosti (F') je bil določen pri aktivni osvetlitvi v razponu $120\text{--}150 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. Maksimalno fluorescenca pri aktivni osvetlitvi (F_m') smo izmerili z žarkom nasičenja v šestih (pri četrti meritvi v treh) ponovitvah za vsako obravnavanje. Z meritvami smo dobili podatke za fotokemično dušenje $qP = (F_m' - F_t)/(F_m' - F_0')$ in nefotokemično dušenje fluorescence $qN = (F_m - F_m')/F_m'$. Parametri fluorescence so prikazani na sliki 9. Relativno hitrost transporta elektronov – ETR (angl. relative electron transport rate) smo dobili z enačbo $PSII * PAR * 0,5 * ETR\text{-faktor}$, kjer je PAR fotosintezno aktivno sevanje (angl. photosynthetically active radiation), s faktorjem 0,5 upoštevamo, da 50 % celotne absorpcije doseže $PSII$ in ETR-faktor določa frakcijo vpadne svetlobe, ki je ocena absorpcije vzorca.



Slika 9: Parametri fluorescence klorofila pri temotno in svetlobno adaptiranem listu.
Figure 9: Chlorophyll fluorescence parameters at the dark- and photo-adapted leaf.

3.3.2.4 Meritev netofotosinteze, prevodnosti listnih rež in transpiracije

Netofotosintezo (A_N), prevodnost listnih rež (g_s) in transpiracijo (Tr) smo merili na listih starševskih linij s pomočjo prenosnega aparata fotosinteznega sistema LI-6400 (LI-COR, Lincoln, Nebraska, ZDA). Najprej smo na aparatu nastavili parametre, čim bolj enake pogojem, v katerih so rastle rastline, da jih je aparat vzdrževal v kiveti za vse rastline enako. Jakost svetlobe = $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; $\text{CO}_{2\text{ref}}$ = 380 – 400 ppm; temperatura = 27°C ; RH_{ref} = 45 – 65%. Meritve smo opravili na sredinskem sestavljenem listu, po navodilih proizvajalca. Učinkovitost izrabe vode – WUE (angl. water use efficiency) smo izračunali po formuli: $\text{WUE} = \frac{A_N}{Tr}$.

3.3.3 Vrednotenje morfoloških in fenoloških lastnosti ter velikosti pridelka

Morfološke in fenološke lastnosti ter velikost pridelka smo vrednotili pri starševskih linijah in 82 rastlinah RIL (Preglednica 3, Priloga A). Izbrali smo morfološke znake, ki so najpogostejše navedeni v znanstvenih objavah in so povzeti po dveh seznamih deskriptorjev za navadni fižol: IBPGR (The International Board for Plant Genetic Resources) ter Phaselieu. Med poskusom smo rastlinam prešteli dneve od začetka rasti (dan kalitve) do cvetenja ter pojava strokov. Podatke smo zapisali, ko je bilo na rastlini več kot 50 cvetov ali strokov. Ko so bili stroki zreli (povprečno 55 dni rasti), smo pridelek vrednotili kot število strokov na rastlino, število semen na strok in maso 100 semen (g).

Preglednica 3: Seznam 19 proučevanih morfoloških znakov rastlin sorte 'Tiber', sorte 'Starozagorski črn' in 82 rekombinantnih inbridiranih linij. ¹ I – omejena pokončna grmičasta oblika rasti, II – neomejena pokončna grmičasta oblika rasti, III – neomejena neplezalna in polplezalna oblika rasti, IV – neomejena plezalna oblika rasti (Singh, 1991).

Table 3: List of 19 evaluated morphological characters of common bean cultivars 'Tiber', 'Starozagorski črn' and 82 recombinant inbred lines. ¹ I – determinate upright bush growth habit, II – indeterminate upright bush growth habit, III – indeterminate prostrate non-climbing and semi-climbing bush growth habit, IV – indeterminate weak-stemmed climbing growth habit (Singh, 1991).

Št.	Rastlinski organ	Morfološki znak	Fenotip
1.	Cvet	Št. dni do cvetenja	
2.	Cvet	Oblika brakteole	Srčasta, jajčasta, suličasta, trikotna
3.	Cvet	Velikost brakteole	Majhna, srednje velika, velika
4.	Cvet	Barva jadra	Vijolična, roza, roza z vijoličnimi pegami, roza z vijoličnim robom, rdeča, zelena, bela, bela z roza progami, bela z roza robom
5.	Cvet	Žilnatost jadra ob osnovi	Žilnato, gladko
6.	Steblo	Tip (oblika) rasti ¹	I, II, III, IV
7.	Steblo	Barva stebila	Zelena, zelena z rdečimi progami
8.	List	Oblika	Srčasta, jajčasta, romboidna, suličasta
9.	List	Dlačice na zgornji ploskvi	Redke in kratke, goste in dolge
10.	Strok	Št. dni do strokov	
11.	Strok	Pozicija kljuna	Hrbtna, sredinska
12.	Strok	Ukrivljenost	Raven, nekoliko ukrivljen, ukrivljen, dvojno zavrt
13.	Strok	Barva svežega stroka	Rumen z vijoličnimi progami, zelen z vijoličnimi progami, rumen, zelen
14.	Strok	Št. strokov na rastlino	
15.	Seme	Oblika	Okrogla, eliptična, kuboidna-valjasta, ledvičasta, ploščata
16.	Seme	Barvni vzorec	Marmoriran, pikčast, progast, pegast, brez vzorca
17.	Seme	Osnovna barva	Črna, vijolična, rdeča, rjava, rjavorumena, rumena, siva, bela
18.	Seme	Št. semen na strok	
19.	Seme	Masa 100 semen (g)	

3.3.4 Analiza z molekulskimi markerji

3.3.4.1 Izolacija in kvantifikacija DNA

Izolacija genomske DNA iz rastlinskega listnega tkiva starševskih linij in RIL fižola je potekala na aparatu za ekstrakcijo nukleinskih kislin, MagMAXTM Express (Applied Biosystems, ZDA), z uporabo BioSprint 15 DNA Plant kita (Qiagen, ZDA) s prilagojenim volumnom reagentov količini rastlinskega materiala v analizi. Postopek omogoča avtomatsko čiščenje genomske DNA z uporabo magnetnih delcev (angl. »MagAttract technology«). DNA se veže na kremenasto površino magnetnih delcev in se s pomočjo magnetnih palčk prenaša iz stripa v strip z različnimi alkoholnimi pufri ter etanolom, kjer se spere. Sledi hitro sušenje na zraku. Končno DNA dobimo raztopljeno v pufru ali vodi.

Rastlinske vzorce za izolacijo DNA smo pripravili tako, da smo v mikrocentrifugirke z 90–140 mg listnega tkiva dodali 200 µl RLT lizacijskega pufra in jekleni kroglici ter homogenizirali s pomočjo aparata za razkrojevanje tkiv TissueLyser (Retsch, Nemčija) za

štiri minute na maksimalni frekvenci (30 s^{-1}). Po 15-minutni inkubaciji pri $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ smo vzorce centrifugirali 11 minut pri relativni centrifugalni sili 12.000 g pri $21\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Na nosilec s kolonami (Applied Biosystems, ZDA) za robota MagMax smo si pripravili naslednje reagentne:

1. kolona: $150\text{ }\mu\text{l}$ lizata vzorca, $80\text{ }\mu\text{l}$ 2-propanola in $10\text{ }\mu\text{l}$ magnetne suspenzije (predhodno 3–5 minutno mešanje z vrtinčenjem),
2. kolona: $200\text{ }\mu\text{l}$ RPW pufru za izpiranje DNA (pred prvo uporabo dodali 125 ml 2-propanola in $220\text{ }\mu\text{l}$ RNaze),
3. in 4. kolona: po $200\text{ }\mu\text{l}$ 96 % etanola,
5. kolona: $80\text{ }\mu\text{l}$ TE pufru [10 mM Tris-HCl ($\text{pH } 8,0$) 1 mM EDTA ($\text{pH } 8,0$)].

Program za izolacijo DNA, ki smo ga predhodno naložili na aparat, je trajal približno 35 minut. Končno DNA smo shranili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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

3.3.4.2 Izolacija in kvantifikacija RNA

RNA je bila izolirana iz listnega tkiva rastlin starševskih linij v treh stopnjah suše in v rehidraciji ter iz kontrolnih rastlin. Za izolacijo smo uporabili Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA). Pred začetkom postopka smo 2 uri sterilizirali terilnice v pečici, pri $230\text{ }^{\circ}\text{C}$ in avtoklavirali vse ostale pripomočke ter jim odstranili encime za razgradnjo RNA z RNase free water (Qiagen, ZDA). Terilnice smo najprej primerno shladili s tekočim dušikom, nato pa smo dodali 90–110 mg listnega tkiva, ga zmleli v fin prah in stresli v 2 ml mikrocentrifugirko z že pripravljeno $500\text{ }\mu\text{l}$ raztopino liznega pufru z dodanim 2-Merkaptoetanolom za sprostitvev RNA, inaktivacijo ribonukleaz in odstranitev sekundarnih metabolitov, kot so gradniki polifenolov. Vzorce smo takoj (vsaj 30 sekund) vrtinčili (MaxiMax II, Thermolyne, ZDA) in jih za 3–5 minut inkubirali v vodni kopeli pri $56\text{ }^{\circ}\text{C}$. S triminutnim centrifugiranjem pri maksimalni relativni centrifugalni sili 16.000 g smo odstranili odpadne celične ostanke. Nastali supernatant smo prenesli v novo priloženo membransko kolono, postavljeno v 2 ml zbiralno mikrocentrifugirko. Z minutnim centrifugiranjem pri maksimalni hitrosti smo odstranili še zadnje odpadne celične ostanke. Ker rastlinski material močno variira v vsebnosti vode in trdne snovi, sta za vezavo RNA v tem postopku opisana dva protokola. Mi smo izbrali bolj splošni Protokol A. V očiščen vzorec smo dodali $500\text{ }\mu\text{l}$ vezne raztopine in zmešali s pipetiranjem. $700\text{ }\mu\text{l}$ te zmesi smo odpipetirali v drugo, novo membransko kolono, postavljeno v 2 ml zbiralno mikrocentrifugirko in 1 minuto centrifugirali pri maksimalni hitrosti za vezavo RNA. Tekočino, ki je stekla skozi membrano, smo zavrgli,

mikrocentrifugirko osušili in ponovili postopek z ostankom vzorca. V fazi čiščenja RNA smo uporabili »On-Column DNase I Digest Set« za odstranitev ostankov DNA. RNA smo očistili s 300 µl raztopine za čiščenje 1 (angl. »Wash solution« – WS 1) in 1 minuto centrifugirali pri maksimalni hitrosti. Odpadno tekočino smo zavrgli in osušili mikrocentrifugirko. Za vsak vzorec smo pripravili 10 µl DNase I in 70 µl DNase presnovnega pufra in nežno zmešali ter pustili na sobni temperaturi 15 minut. Vzorce smo nato očistili s 500 µl WS 1 in centrifugirali 1 minuto na maksimalni hitrosti. Odpadno tekočino smo zavrgli. Sledilo je čiščenje z uporabo raztopine za čiščenje 2 (WS 2). Postopek s 500 µl WS 2 in 30-sekundnim centrifugiranjem na maksimalni hitrosti smo dvakrat ponovili in zavrgli odpadno tekočino. Vzorce smo nato osušili z minutnim centrifugiranjem. Mikrocentrifugirko smo previdno zamenjali z novo. Vzorcem smo dodali 50 µl elucijske raztopine, počakali 1 minuto in centrifugirali na maksimalni hitrosti za 1 minuto. 20 µl dobljenega eluata z RNA smo shranili v zamrzovalnik pri -20 °C, ostalo smo za daljše shranjevanje shranili pri -80°C.

Uspešnost izolacije smo preverili na elektroforezi z 1,4% agaroznim gelom. Količino izolirane RNA smo izmerili na biospektrofotometru (BioSpectrophotometer, Eppendorf, Hamburg, Nemčija) po protokolu dobavitelja. Za analizo RNA vzorcev smo uporabili Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, ZDA). V 65 µl gela (RNA 6000 Nano Gel Matrix) smo dodali 1 µl koncentrata RNA-barvila. Vse skupaj smo dobro zmešali in centrifugirali pri 13.000 g 10 minut. 1 ml gela smo nanесли v za to predvideno mesto na novem čipu (»RNA chip«) in sledili protokolu, kjer s pritiskom injekcije sprožilne naprave (Chip priming station, Agilent 2100 Bioanalyzer System, ZDA) iz 1 ml zraka dosežemo, da se gel enakomerno razporedi po čipu po vseh 12 luknjicah za vzorce. Nato smo v naslednji dve označeni luknjici dodali še 9 µl gela. V naslednji fazi smo v vse luknjice, namenjene za vzorce, in v luknjico, označeno z #, dodali 5 µl markerja RNA, kamor smo dodali še 1 µl markerja z znano dolžinsko lestvico. Ostalih 12 luknjic smo napolnili z 1 µl naših RNA vzorcev. Čip smo s pripravljenimi raztopinami vrtinčili (IKA vortex mixer, Agilent 2100 Bioanalyzer System, ZDA) 1 minuto pri 2400 rpm. V programu smo izbrali analizo za RNA rastlinskih vzorcev, vnesli podatke vzorcev in začeli z analizo. Ob koncu analize smo dobili podatke koncentracij RNA in čistosti vzorca z RIN- (angl. »RNA integrity number«) vrednostmi.

3.3.4.3 Mikrosatelitni markerji

V analizo starševskih linij z mikrosatelitnimi markerji je bilo vključenih 477 začetnih oligonukleotidnih parov (Priloga B), izbranih iz predhodno objavljenih raziskav navadnega fižola (Yu in sod., 2000; Gaitan-Solis in sod. 2002; Métais in sod., 2002, Blair in sod. 2003, 2008, 2009a, 2009b; Buso in sod., 2006; Benchimol in sod., 2007; Hanai in sod., 2007, 2010; Cordoba in sod. 2012, Chen in sod., 2014). Osredotočili smo se na markerje, ki so se predhodno izkazali za bolj informativne, izbirali pa smo jih tudi glede na lokacijo v genomu, saj smo želeli doseči čim večjo pokritost fižolovega genoma. Najprej smo analizirali starševski liniji in, v primeru polimorfizma, analizo opravili tudi na RIL. Analizo smo izvedli s pomočjo PCR smo v dveh cikličnih termostatih; ATC 401 (Apollo Instrumentation, ZDA) in SureCycler 8800 (Agilent Technologies, ZDA).

Reakcijsko mešanico PCR pripravili v končnem volumnu 10 µl in je vsebovala:

- 20 ng genomske DNA,
- 10 × PCR pufer (Biotools, ZDA),
- 50 mM MgCl₂ (Biotools, ZDA),
- 10 µM koncentracijo vsakega deoksinukleotida trifosfata (dNTP) (Promega, ZDA),
- 10 µM koncentracijo vsakega začetnega oligonukleotida,
- 0,5 enote *Taq* DNA-polimeraze (Biotools, ZDA),
- deionizirano vodo (Sigma Aldrich, ZDA), dodano do končnega volumna.

Pogoji pomnoževanja:

začetna 5-minutna denaturacija pri 94 °C,

40 ciklov s ponavljanjem: a) 30 sekund denaturacije pri 94 °C,
 b) 30 sekund prilagajanja začetnih oligonukleotidov pri
 temperaturi Ta (Priloga B),
 c) 45 sekund sinteze DNA pri 72 °C,

zaključna 5-minutna elongacija pri 72 °C ter ohlajanje in vzdrževanje pri 4 °C.

Produkti PCR so bili ločeni na 1,4% agarozni in/ali na kapilarni elektroforezi po postopku, opisanem v poglavju 3.3.4.12.

Nekatere polimorfizme, kjer je bila razlika med pomnoženimi fragmenti manjša od 3 bp, smo preverili na napravi ABI Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, ZDA) (postopek opisan v poglavju 3.3.4.12). Ker gre za avtomatsko lasersko detekcijo namnoženih fragmentov, smo protokol pomnoževanja prilagodili tako, da je bil pri vsakem paru eden od začetnih oligonukleotidov fluorescentno označen [FAM (5-karboksifluorescein), HEX (6-karboksi-heksakloro-fluorescein), TAMRA (6-karboksi-tetrametil-rodamin)]. Uporabili smo modificirani protokol ekonomične metode s »fluorescentnimi repki« (Schuelke, 2000). Prvemu, začetnemu nukleotidu, smo v procesu sinteze na 5' konec pripeli 18 bp dolg univerzalni M13(-21) repek (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') in dodali tretji univerzalni fluorescentno označeni oligonukleotid M13(-21).

Prilagojena reakcijska mešanica PCR v končnem volumnu 10 µl je vsebovala:

- 20 ng genomske DNA,
- 10 × PCR pufer (Biotools, ZDA),
- 50 mM MgCl₂ (Biotools, ZDA),
- 10 mM koncentracije vsakega deoksinukleotida trifosfata (Promega, ZDA),
- 10 µM koncentracije prvega začetnega oligonukleotida z dodanim 18 bp dolgim zaporedjem,
- 10 µM koncentracije drugega začetnega oligonukleotida,
- 10 µM FAM-M13(-21) ali HEX-M13(-21) ali TAMRA-M13(-21) (Applied Biosystems),
- 0,2 enote *Taq* DNA-polimeraze (Biotools, ZDA),
- deionizirano vodo (Sigma Aldrich, ZDA), dodano do končnega volumna.

Prilagojeni pogoji pomnoževanja:

začetna 5-minutna denaturacija pri 94 °C,

- 10 ciklov s ponavljanjem: a) 30 sekund pri 94 °C,
 b) 60 sekund pri 60 °C, kjer se je v vsakem naslednjem ciklu
 temperatura znižala za 0,5 °C,
 c) 90 sekund pri 72 °C,
30 ciklov s ponavljanjem: a) 30 sekund pri 94 °C,
 b) 45 sekund pri 55 °C,
 c) 30 sekund pri 72 °C,
zaključna 8-minutna elongacija pri 72 °C ter ohlajanje in vzdrževanje pri 4 °C.

3.3.4.4 Markerji AFLP

V analizo AFLP starševskih linij smo vključili 256 različnih kombinacij oligonukleotidnih parov in adapterja *EcoRI* ter *MseI* (Preglednica 4). V primeru polimorfizma smo analizo opravili tudi na RIL. Pri izvedbi te analize smo sledili protokolu, ki so ga razvili Vos in sod. (1995). Analizo AFLP sestavljajo 4 faze; restrikcija genomske DNA, ligacija adapterjev, predamplifikacija in selektivna amplifikacija, ki so opisane v naslednjih podpoglavjih.

Restrikcija genomske DNA in ligacija adapterjev

Pri temperaturi 37 °C smo za 2 uri inkubirali restrikcijsko mešanico s 500 ng genomske DNA, s po 2,5 enotama *EcoRI* in *MseI* (New England Biolabs) restrikcijskih endonukleaz v raztopini 1X NEBuffer *EcoRI* pufru (50 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 0,025 % Triton X-100 pH 7,5) ter deionizirane vode do končnega volumna 40 µl. Vzorce smo med inkubacijo občasno premešali. Restrikcijskim vzorcem smo nato dodali 10 µl ligacijske mešanice [5 µM *EcoRI*-adapter; 50 µM *MseI*-adapter; 1X T4 DNA ligazni pufer (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM ditiotritol, 1 mM ATP, 25 µg/µl BSA pH 7,8); 1 enoto Weiss T4 – DNA ligaze] in pri isti temperaturi inkubirali še 2–3 ure. Za izdelavo adapterja *EcoRI* smo najprej liofilizirana oligonukleotida *EcoRI*-linker1 in *EcoRI*-linker2 redčili do koncentracije 1 µg/ml. Reakcijsko mešanico smo pripravili s 5 µM *EcoRI*-linker1, 50 µM *EcoRI*-linker2 in 1M Tris-HCl (pH 8) v skupnem volumnu 40 µl. Priprava adapterjev je potekala v cikličnem termostatu PE9700 (Applied Biosystems, ZDA), kjer smo reakcijsko mešanico 5 minut izpostavili temperaturi 95 °C in pustili, dokler se ciklični termostat ni ohladil na sobno temperaturo.

Preglednica 4: Seznam in nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov ter adapterjev, uporabljenih v analizi AFLP. Cy5 – cianin 5 fluorescentno barvilo.

Table 4: List and sequences of primers and adapters used in AFLP analysis. Cy5 – cyanin 5 fluorescent dy.

Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje 5'-3'
<i>Eco</i> RI-linker1	CTC GTA GAC TGC GTA CC
<i>Eco</i> RI-linker2	AAT TGG TAC GCA GTC TAC
<i>Eco</i> RI-adapter	CTC GTA GAC TGC GTA CC CAT CTG ACG CAT GGT TAA
<i>Mse</i> I-linker1	GAC GAT GAG TCC TGA G
<i>Mse</i> I-linker2	TAC TCA GGA CTC AT
<i>Mse</i> I-adapter	GAC GAT GAG TCC TGA G TA CTC AGG ACT CAT
<i>Eco</i> RI*	GAC TGC GTA CCA ATT C
<i>Mse</i> I*	GAT GAG TCC TGA GTA A
<i>Eco</i> RI*+A	GAC TGC GTA CCA ATT CA
<i>Mse</i> I*+C	GAT GAG TCC TGA GTA AC
<i>Eco</i> RI*+AGC	Cy5GAC TGC GTA CCA ATT CAG C
<i>Eco</i> RI*+AGG	Cy5GAC TGC GTA CCA ATT CAG G
<i>Eco</i> RI*+ACC	Cy5GAC TGC GTA CCA ATT CAC C
<i>Eco</i> RI*+ACT	Cy5GAC TGC GTA CCA ATT CAC T
<i>Eco</i> RI*+ACG	Cy5GAC TGC GTA CCA ATT CAC G
<i>Eco</i> RI*+AAA	Cy5GAC TGC GTA CCA ATT CAA A
<i>Eco</i> RI*+AGA	Cy5GAC TGC GTA CCA ATT CAG A
<i>Eco</i> RI*+AAC	Cy5GAC TGC GTA CCA ATT CAA C
<i>Eco</i> RI*+ACA	Cy5GAC TGC GTA CCA ATT CAC A
<i>Eco</i> RI*+AAG	Cy5GAC TGC GTA CCA ATT CAA G
<i>Eco</i> RI*+AAT	Cy5GAC TGC GTA CCA ATT CAA T
<i>Eco</i> RI*+ATA	Cy5GAC TGC GTA CCA ATT CAT A
<i>Eco</i> RI*+ATC	Cy5GAC TGC GTA CCA ATT CAT C
<i>Eco</i> RI*+ATT	Cy5GAC TGC GTA CCA ATT CAT T
<i>Eco</i> RI*+ATG	Cy5GAC TGC GTA CCA ATT CAT G
<i>Eco</i> RI*+AGT	Cy5GAC TGC GTA CCA ATT CAG T
<i>Mse</i> I*+CAG	GAT GAG TCC TGA GTA ACA G
<i>Mse</i> I*+CAT	GAT GAG TCC TGA GTA ACA T
<i>Mse</i> I*+CAC	GAT GAG TCC TGA GTA ACA C
<i>Mse</i> I*+CAA	GAT GAG TCC TGA GTA ACA A
<i>Mse</i> I*+CTC	GAT GAG TCC TGA GTA ACT C
<i>Mse</i> I*+CTT	GAT GAG TCC TGA GTA ACT T
<i>Mse</i> I*+CGC	GAT GAG TCC TGA GTA ACG C
<i>Mse</i> I*+CTA	GAT GAG TCC TGA GTA ACT A
<i>Mse</i> I*+CTG	GAT GAG TCC TGA GTA ACT G
<i>Mse</i> I*+CGA	GAT GAG TCC TGA GTA ACG A
<i>Mse</i> I*+CGT	GAT GAG TCC TGA GTA ACG T
<i>Mse</i> I*+CGG	GAT GAG TCC TGA GTA ACG G
<i>Mse</i> I*+CCA	GAT GAG TCC TGA GTA ACC A
<i>Mse</i> I*+CCC	GAT GAG TCC TGA GTA ACC C
<i>Mse</i> I*+CCT	GAT GAG TCC TGA GTA ACC T
<i>Mse</i> I*+CCG	GAT GAG TCC TGA GTA ACC G

Predamplifikacija

Tretja faza analize AFLP je postopek predamplifikacije, ki vključuje prvo selektivno namnoževanje DNA v PCR, pri čemer se uporablja začetne oligonukleotide, sestavljene iz

nukleotidnega zaporedja adapterjev in restrikcijskega mesta ter ene dodatne selektivne baze (v našem primeru *EcoRI**+A in *MseI**+C).

V končni volumen 50 µl reakcijske mešanice predamplifikacije smo dodali 5 µl ligacijske mešanice (50 ng DNA), 1X PCR pufer [10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, pH 8,3], 75 ng *EcoRI**+A začetnega nukleotida, 75 ng *MseI**+C začetnega nukleotida, 1,5 enote *Taq* DNA polimeraze (Biotools, ZDA) in 0,2 mM koncentracije vsakega deoksinukleotida trifosfata (Qiagen, ZDA).

Predamplifikacija je potekala v cikličnem termostatu PE9700 (Applied Biosystems, ZDA) po naslednjem temperaturnem profilu:

začetna 4-minutna denaturacija pri 94 °C,

20 ciklov s ponavljanjem: a) 30 sekund pri 94 °C,
 b) 60 sekund pri 56 °C,
 c) 105 sekund pri 72 °C,

zaključna 3-minutna elongacija pri 72°C ter ohlajanje in vzdrževanje temperature 4 °C.

Po končani analizi smo vzorce shranili v hladilnik pri 4 °C.

Selektivna amplifikacija

V četrti, zaključni fazi analize AFLP, se razredčene fragmente DNA iz predamplifikacije uporabi v glavnem selektivnem pomnoževanju z začetnimi oligonukleotidi, sestavljenimi iz nukleotidnega zaporedja adapterjev in restrikcijskega mesta ter treh selektivnih baz, kar zmanjša število namnoženih fragmentov in omogoča zanesljivejše vrednotenje fragmentov. Po končani analizi smo produkte predamplifikacije redčili v dvakrat destilirani vodi v razmerju 1:8. Končni volumen reakcije, 15 µl, je vseboval 3 µl redčenih produktov predamplifikacije in naslednjo reakcijsko mešanico: 1X PCR pufer, 15 ng *EcoRI* začetnega nukleotida s tremi selektivnimi nukleotidi, ki je bil na 5'-koncu označen s Cy5-barvilom, 15 ng *MseI* začetnega nukleotida s tremi selektivnimi nukleotidi, 0,45 enote *Taq* DNA-polimeraze in 0,2 mM koncentracijo vsakega deoksinukleotid trifosfata. Vsi začetni oligonukleotidi so bili izdelani pri MWG-Biotech v Nemčiji.

Analiza s pomočjo PCR, s končnim volumnom 15 µl, je potekala na cikličnem termostatu PE9700 (Applied Biosystems, ZDA) po naslednjem temperaturnem profilu:

začetna 4-minutna denaturacija pri 94 °C,

36 ciklov s ponavljanjem: a) 30 sekund pri 94 °C,
 b) 30 sekund pri 65 °C–56 °C,
 c) 60 sekund pri 72 °C,

zaključna 5-minutna elongacija pri 72 °C ter ohlajanje in vzdrževanje temperature 4 °C.

Temperatura prilagajanja začetnih oligonukleotidov se je prvih 13 ciklov temperaturnega programa PCR postopoma zniževala za 0,7 °C, potem pa je ostala nespremenjena na 56 °C do konca reakcije. Po končani AFLP-analizi smo vzorce shranili v hladilnik pri 4 °C.

Produkti PCR so bili ločeni na 2% agarozni in/ali na kapilarni elektroforezi po postopku, opisanem v poglavju 3.3.4.12.

3.3.4.5 Markerji SRAP

Starševski liniji smo analizirali s skupno 64 kombinacijami oligonukleotidnih parov molekulskih markerjev SRAP izbranih iz literature (Li in Quiros, 2001; Budak in sod., 2004) (Preglednica 5). SRAP je markerski sistem na osnovi pomnoževanja PCR s 17 bp dolgim smernim in 18 bp dolgim protismernim začetnim oligonukleotidom. Prvim desetim bazam smernega oligonukleotida na 5'-koncu sledi sekvenca CCGG in nato tri selektivni nukleotidi na 3'-koncu. Protismerne oligonukleotide sestavlja enajst enakih baz, ki jim sledi zaporedje AATT, in tri selektivne baze nukleotidov na 3'-koncu. Variacija treh selektivnih nukleotidov oblikuje začetne nukleotide z enakim osnovnim zaporedjem. Analizo smo s pomočjo PCR izvedli v cikličnem termostatu ATC 401 (Apollo Instrumentation, ZDA).

Reakcijska mešanica PCR je v končnem volumnu 25 µl vsebovala:

- 20 ng genomske DNA,
- 10 × PCR pufer (Biotools, ZDA),
- 20 mM MgCl₂ (Biotools, ZDA),
- 200 µM koncentracije vsakega deoksinukleotida trifosfata (Promega, ZDA),
- 0,8 µM koncentracije vsakega začetnega oligonukleotida,
- 1 enoto *Taq* DNA-polimeraze (Biotools, ZDA),
- deionizirano vodo (Sigma Aldrich, ZDA), dodano do končnega volumna.

Preglednica 5: Seznam začetnih oligonukleotidov markerjev SRAP in njihove sekvence. F – smerni oligonukleotid, R – protismerni oligonukleotid.

Table 5: List and sequences of SRAP primers. F – forward primer, R – reverse primer.

Ime	Tarčni gen	Sekvenca 5'-3'	Vir
me 1	SRAP	F: 5'-TGA GTC CAA ACC GGA TA-3'	Li in Quiros, 2001
me 2	SRAP	F: 5'-TGA GTC CAA ACC GGA GC-3'	Li in Quiros, 2001
me 3	SRAP	F: 5'-TGA GTC CAA ACC GGA AT-3'	Li in Quiros, 2001
me 4	SRAP	F: 5'-TGA GTC CAA ACC GGA CC-3'	Li in Quiros, 2001
me 5	SRAP	F: 5'-TGA GTC CAA ACC GGA AG-3'	Li in Quiros, 2001
me 6	SRAP	F: 5'-TGA GTC CAA ACC GGA CA-3'	Budak in sod., 2004
me 7	SRAP	F: 5'-TGA GTC CAA ACC GGA CG-3'	Budak in sod., 2004
me 8	SRAP	F: 5'-TGA GTC CAA ACC GGA CT-3'	Budak in sod., 2004
em 1	SRAP	R: 5'-GAC TGC GTA CGA ATT AAT-3'	Li in Quiros, 2001
em 2	SRAP	R: 5'-GAC TGC GTA CGA ATT TGC-3'	Li in Quiros, 2001
em 3	SRAP	R: 5'-GAC TGC GTA CGA ATT GAC-3'	Li in Quiros, 2001
em 4	SRAP	R: 5'-GAC TGC GTA CGA ATT TGA-3'	Li in Quiros, 2001
em 5	SRAP	R: 5'-GAC TGC GTA CGA ATT AAC -3'	Li in Quiros, 2001
em 6	SRAP	R: 5'-GAC TGC GTA CGA ATT GCA-3'	Li in Quiros, 2001
em 7	SRAP	R: 5'-GAC TGC GTA CGA ATT CAA-3'	Budak in sod., 2004
em 8	SRAP	R: 5'-GAC TGC GTA CGA ATT CAC-3'	Budak in sod., 2004

Pogoji pomnoževanja:

začetna 3-minutna denaturacija pri 95 °C,

5 ciklov s ponavljanjem: a) 60 sekund pri 94 °C,
b) 60 sekund pri 35 °C,
c) 60 sekund pri 72 °C,

35 ciklov s ponavljanjem: a) 60 sekund pri 94 °C,
b) 60 sekund pri 50 °C,

c) 60 sekund pri 72 °C,
zaključna 8-minutna elongacija pri 72°C ter ohlajanje in vzdrževanje pri 4 °C.

Produkti PCR so bili ločeni na 1,5% agarozni in na kapilarni elektroforezi po postopku, opisanem v poglavju 3.3.4.12.

3.3.4.6 Markerji RGAP

Starševski liniji smo analizirali s skupno 68 kombinacijami oligonukleotidnih parov molekulskih markerjev RGAP, izbranih iz raziskave Mutlu in sod. (2006), dizajniranih iz močno ohranjenih motivov kinaze-1a (K) in hidrofobne domene (HD) tipa NBS-LRR (angl. nucleotide-binding site – leucine rich repeat) rezistenčnih genov (Preglednica 6). Analizo s pomočjo PCR smo izvedli v cikličnem termostatu ATC 401 (Apollo Instrumentation, ZDA).

Preglednica 6: Seznam začetnih oligonukleotidov markerjev RGAP in njihove sekvence.
Table 6: List and sequences of RGAP primers.

Ime	Tarčni gen	Sekvenca 5'-3'	Vir
K 1	RGAP - P-zanka	5'-GGS GGG GTG GGG AAG ACS AC-3'	Mutlu in sod., 2006
K 2	RGAP - P-zanka	5'-GGW GGG GTT GGG AAG ACW AC-3'	Mutlu in sod., 2006
K 3	RGAP - P-zanka	5'-GGS GGS GTG GGT AAR ACD AC-3'	Mutlu in sod., 2006
K 4	RGAP - P-zanka	5'-GGT GGC GTG GGC AAG ACD AC-3'	Mutlu in sod., 2006
K 5	RGAP - P-zanka	5'-GGG GGS ATG GGY AAR ACD AC-3'	Mutlu in sod., 2006
K 6	RGAP - P-zanka	5'-GGH GGG ATG GGG AAR ACD AC-3'	Mutlu in sod., 2006
K 7	RGAP - P-zanka	5'-GGV GGV YTN GGC AAR ACD AC-3'	Mutlu in sod., 2006
K 8	RGAP - P-zanka	5'-GGV GGV TCN GGS AAR ACD AC-3'	Mutlu in sod., 2006
K 9	RGAP - P-zanka	5'-GGV GGV GTN GGS AAR AGY AC-3'	Mutlu in sod., 2006
K 10	RGAP - P-zanka	5'-GGV GGV ATH GGS AAR ACD AC-3'	Mutlu in sod., 2006
HD 2	RGAP - hidrof. del	5'-CCA ACG CCA ATG GAA GAC C-3'	Mutlu in sod., 2006
HD 3	RGAP - hidrof. del	5'-AAG NCT AAR GGG AGG GCC-3'	Mutlu in sod., 2006
HD 4	RGAP - hidrof. del	5'-GAG CGC CAR CGG GAG GCC-3'	Mutlu in sod., 2006
HD 5	RGAP - hidrof. del	5'-GAG VGC GAA GGG GAG GCC-3'	Mutlu in sod., 2006
HD 6	RGAP - hidrof. del	5'-GAG VGC CAR CGG NGA GCC-3'	Mutlu in sod., 2006
HD 7	RGAP - hidrof. del	5'-GAG VGC CAR SGG RTG GCC-3'	Mutlu in sod., 2006
HD 8	RGAP - hidrof. del	5'-GAG VGC CAR SGG YTT GCC-3'	Mutlu in sod., 2006
HD 9	RGAP - hidrof. del	5'-GAG VGC CAR SGG RTT GCC-3'	Mutlu in sod., 2006
HD 10	RGAP - hidrof. del	5'-HTA VGC CAR KGG RTT GCC-3'	Mutlu in sod., 2006
HD 2	RGAP - hidrof. del	5'-CCA ACG CCA ATG GAA GAC C-3'	Mutlu in sod., 2006
HD 3	RGAP - hidrof. del	5'-AAG NCT AAR GGG AGG GCC-3'	Mutlu in sod., 2006

Reakcijska mešanica PCR je v končnem volumnu 10 µl vsebovala:

- 20 ng genomske DNA,
- 1 × PCR pufer (Biotools, ZDA),
- 2 mM MgCl₂ (Biotools, ZDA),
- 100 µM koncentracije vsakega deoksinukleotida trifosfata (Promega, ZDA),
- 2 µM koncentracije vsakega začetnega oligonukleotida,
- 1 enoto *Taq* DNA-polimeraze (Biotools, ZDA),
- deionizirano vodo (Sigma Aldrich, ZDA), dodano do končnega volumna.

Pogoji pomnoževanja:

začetna 75-sekundna denaturacija pri 94 °C,

5 ciklov s ponavljanjem: a) 10 sekund pri 94 °C,

b) 60 sekund pri 60 °C,

c) 10 sekund pri 72 °C,

5 ciklov s ponavljanjem: a) 10 sekund pri 91 °C,

b) 45 sekund pri 54 °C,

c) 10 sekund pri 72 °C,

38 ciklov s ponavljanjem: a) 10 sekund pri 91 °C,

b) 20 sekund pri 45 °C,

c) 10 sekund pri 72 °C,

zaključna 4,5-minutna elongacija pri 72 °C ter ohlajanje in vzdrževanje pri 4 °C.

Produkti PCR so bili ločeni na 1,2% agarozni in na kapilarni elektroforezi po postopku, opisanem v poglavju 3.3.4.12.

3.3.4.7 Markerji SRAP-RGA

Za analizo starševskih linij z molekulskimi markerji SRAP-RGA smo uporabili 16 SRAP in 17 RGA začetnih oligonukleotidov, opisanih v prejšnjih dveh poglavjih, za skupno 136 kombinacij oligonukleotidnih parov (Priloga J). Analizo smo s pomočjo PCR izvedli v cikličnem termostatu ATC 401 (Apollo Instrumentation, ZDA).

Reakcijska mešanica PCR je v končnem volumnu 15 µl vsebovala:

- 20 ng genomske DNA,
- 1 × PCR pufer (Biotools, ZDA),
- 2 mM MgCl₂ (Biotools, ZDA),
- 100 µM koncentracije vsakega deoksinukleotida trifosfata (Promega, ZDA),
- 3 µM koncentracije vsakega začetnega oligonukleotida,
- 0,6 enote *Taq* DNA-polimeraze (Biotools, ZDA),
- deionizirano vodo (Sigma Aldrich, ZDA), dodano do končnega volumna.

Pogoji pomnoževanja:

začetna 5-minutna denaturacija pri 94 °C,

5 ciklov s ponavljanjem: a) 60 sekund pri 94 °C,

b) 60 sekund pri 38 °C,

c) 75 sekund pri 72 °C,

35 ciklov s ponavljanjem: a) 45 sekund pri 94 °C,

b) 60 sekund pri 55 °C,

c) 75 sekund pri 72 °C,

zaključna 10-minutna elongacija pri 72 °C ter ohlajanje in vzdrževanje pri 4 °C.

Produkti PCR so bili ločeni na 1,5% agarozni in na kapilarni elektroforezi po postopku, opisanem v poglavju 3.3.4.12.

3.3.4.8 Markerji RAPD

Za analizo starševskih linij smo uporabili šest 10 bp dolgih RAPD začetnih oligonukleotidov izbranih iz raziskave Marotti in sod. (2007) (Preglednica 7). Analizo smo s pomočjo PCR izvedli v cikličnem termostatu SureCycler 8800 (Agilent Technologies, ZDA).

Preglednica 7: Seznam začetnih oligonukleotidov markerjev RAPD in njihove sekvence.

Table 7: List and sequences of RAPD primers.

Ime	Tarčni gen	Sekvenca 5'-3'	Vir
FAGR2	RAPD	5'-AGG TGA CCG T-3'	Marotti in sod., 2007
FAGR3	RAPD	5'-CAA ACG TCG G-3'	Marotti in sod., 2007
FAGR4	RAPD	5'-GTT GCC ATC C-3'	Marotti in sod., 2007
FAGR5	RAPD	5'-GGC TGC GAC A-3'	Marotti in sod., 2007
FAGR6	RAPD	5'-AGG CAG AGC A-3'	Marotti in sod., 2007
FAGR10	RAPD	5'-GGT CGA TCT G-3'	Marotti in sod., 2007

Reakcijska mešanica PCR je v končnem volumnu 20 µl vsebovala:

- 20 ng genomske DNA,
- 1 × PCR pufer (Biotools, ZDA),
- 2 mM MgCl₂ (Biotools, ZDA),
- 100 µM koncentracije vsakega deoksinukleotida trifosfata (Promega, ZDA),
- 0,2 µM koncentracije vsakega začetnega oligonukleotida,
- 0,5 enote *Taq* DNA-polimeraze (Biotools, ZDA),
- deionizirano vodo (Sigma Aldrich, ZDA), dodano do končnega volumna.

Pogoji pomnoževanja:

začetna 5-minutna denaturacija pri 94 °C,

45 ciklov s ponavljanjem: a) 60 sekund pri 94 °C,

b) 60 sekund pri 35 °C,

c) 2 minuti pri 72 °C,

zaključna 7-minutna elongacija pri 72 °C ter ohlajanje in vzdrževanje pri 4 °C.

Produkti PCR so bili ločeni na 1,8% agarozni in na kapilarni elektroforezi po postopku, opisanem v poglavju 3.3.4.12.

3.3.4.9 Markerji ISSR in delno specifični markerji

Dvajset začetnih oligonukleotidov markerjev ISSR z nesidranim ali sidranim ponovljivim osnovnim motivom na 5'- ali 3'-koncu in sedem delno specifičnih (semi-random) začetnih oligonukleotidov smo uporabili za gensko analizo starševskih linij. Začetne oligonukleotide smo izbrali iz raziskave Marotti in sod. (2007) (Preglednica 8). Analizo smo s pomočjo PCR za oba tipa molekulskih markerjev izvedli v cikličnem termostatu SureCycler 8800 (Agilent Technologies) po enakem protokolu PCR in pod enakimi pogoji.

Reakcijska mešanica PCR je v končnem volumnu 25 µl vsebovala:

- 20 ng genomske DNA,

- 1 × PCR pufer (Biotools, ZDA),
- 2,5 mM MgCl₂ (Biotools, ZDA),
- 250 μM koncentracije vsakega deoksinukleotida trifosfata (Promega, ZDA),
- 4 μM koncentracije vsakega začetnega oligonukleotida,
- 0,4 enote *Taq* DNA-polimeraze (Biotools, ZDA),
- deionizirano vodo (Sigma Aldrich, ZDA), dodano do končnega volumna.

Pogoji pomnoževanja:

začetna 1,5-minutna denaturacija pri 94 °C,

35 ciklov s ponavljanjem: a) 40 sekund pri 94 °C,
b) 45 sekund pri 45 °C,
c) 90 sekund pri 72 °C,

1 cikel: a) 45 sekund pri 94 °C,
b) 45 sekund pri 44 °C,
c) 5 minut pri 72 °C,

zaključna 10-minutna elongacija pri 72 °C ter ohlajanje in vzdrževanje pri 4 °C.

Produkti PCR so bili ločeni na 1,8% agarozni in na kapilarni elektroforezi po postopku, opisanem v poglavju 3.3.4.12.

Preglednica 8: Seznam začetnih oligonukleotidov ISSR in delno specifičnih markerjev ter njihove sekvence.

Table 8: List and sequences of ISSR and semi-random primers.

Ime	Tarčni gen	Sekvenca 5'-3'	Vir
L0L1	ISSR	5'-CT CT CT CT CT CT CT CT AC-3'	Marotti in sod., 2007
L0L2	ISSR	5'-CT CT CT CT CT CT CT CT GC-3'	Marotti in sod., 2007
L0L3	ISSR	5'-CA CA CA CA CA CA AC-3'	Marotti in sod., 2007
L0L4	ISSR	5'-CA CA CA CA CA CA GT-3'	Marotti in sod., 2007
L0L5	ISSR	5'-GA GA GA GA GA GA GG-3'	Marotti in sod., 2007
L0L6	ISSR	5'-GT GT GT GT GT GT GG-3'	Marotti in sod., 2007
L0L7	ISSR	5'-GA GA GA GA GA GA CC-3'	Marotti in sod., 2007
L0L8	ISSR	5'-GT GT GT GT GT GT CC-3'	Marotti in sod., 2007
L0L9	ISSR	5'-CAC CAC CAC GC-3'	Marotti in sod., 2007
L0L10	ISSR	5'-GAG GAG GAG GC-3'	Marotti in sod., 2007
L0L11	ISSR	5'-CTC CTC CTC GC-3'	Marotti in sod., 2007
L0L12	ISSR	5'-GTG GTG GTG GC-3'	Marotti in sod., 2007
PHV1	ISSR	5'-ACT GAC TGA CTG ACT G-3'	Marotti in sod., 2007
PHV2	ISSR	5'-GAC AGA CAG ACA GAC A-3'	Marotti in sod., 2007
PHV3	ISSR	5'-GCC CTC TCT CTC TCT CTC T-3'	Marotti in sod., 2007
PHV4	ISSR	5'-GGC GTG TGT GTG TGT GTG T-3'	Marotti in sod., 2007
PHV5	ISSR	5'-ACG CAC ACA CAC ACA CAC A-3'	Marotti in sod., 2007
PHV6	ISSR	5'-CCA CTC TCT CTC TCT CTC T-3'	Marotti in sod., 2007
PHV7	ISSR	5'-GTG GTG TGT GTG TGT GT GT-3'	Marotti in sod., 2007
PHV8	ISSR	5'-GAG CAC ACA CAC ACA CACA-3'	Marotti in sod., 2007
FAGR16	delno-specifični	5'- ACT TAC CTG AGG CGC GAC-3'	Marotti in sod., 2007
FAGR17	delno-specifični	5'-ACT TAC CTG CTG GCC GGA-3'	Marotti in sod., 2007
FAGR18	delno-specifični	5'-ACT TAC CTG CCT GCC GAG-3'	Marotti in sod., 2007
FAGR21	delno-specifični	5'-GCA GAG GGC CAG GTA AGT-3'	Marotti in sod., 2007
FAGR22	delno-specifični	5'- ACT TAC CTG CAC CGT ATG-3'	Marotti in sod., 2007
FAGR23	delno-specifični	5'-ACT TAC CTG AGG TCA CCA-3'	Marotti in sod., 2007
FAGR24	delno-specifični	5'-ACT TAC CTG GAC GTG CCG-3'	Marotti in sod., 2007

3.3.4.10 Analiza vpliva suše na izražanje genov, ki kodirajo akvaporine pri starševskih linijah

Izolacija in karakterizacija genov akvaporinov

Rastlinski vzorci za izolacijo in karakterizacijo genov iz navadnega fižola, podobnih akvaporinskemu genom, so bili vzorčeni iz popolnoma razvitega tretjega sestavljenega lista kontrolnih rastlin sorte 'Tiber' po 20 dneh rasti. Izolacija DNA je potekala po opisanem postopku v poglavju 3.3.4.1.

V času našega poskusa akvaporini (AKP) navadnega fižola še niso bili karakterizirani, zato je izolacija in karakterizacija AKP navadnega fižola potekala z uporabo degeneriranih začetnih oligonukleotidov, narejenih na podlagi ohranjenih aminokislinskih motivov PIP in TIP poddružin akvaporinov, izoliranih iz bombaža (Park in sod., 2010) (Preglednica 9).

Preglednica 9: Seznam degeneriranih začetnih oligonukleotidov s sekvencami, pozicijo in degeneriranostjo. F – smerni oligonukleotid, R – protismerni oligonukleotid, TMD – transmembranska domena, L – zanka.

Table 9: List and sequences of degenerate primers with their positions and degeneration. F – forward primer, R – reverse primer, TMD – transmembrane domain, L – zanka.

Ime	Sekvenca	Pozicija	Degeneriranost
PIP F1d	ATGGAGGG(G/T/C)AA(G/A)GA(G/A)GA(G/A)GATG	Začetek	24
PIP F2d	AAGGACTA(T/C)(G/C)(A/T)(G/T)GA(T/C)CCTCC(G/A)C	N terminalni konec	64
PIP F3d	AT(T/C)GC(A/T)TGGGC(T/C)TT(T/C)GGTGG	TMD 2	16
PIP R1d	G(G/C)(A/T)CCAATGAA(G/A/T/C)GG(G/T)CC(C/A)ACC	TMD 6	64
PIP R2d	CC(G/A/T)ACCCAGAA(G/A/T)ATCCA(G/A/T)TG(G/A/T)T	L 5/3. mesto vezave	81
PIP R3d	CC(G/A)GT(G/A/T)CC(G/A)GTGAT(G/T/C)GG(G/A)AT	TMD 5	72
TIP F1d	GG(T/C)TC(G/A/C)GG(A/C)ATGGC(T/C)TT(T/C)AA(T/C)A	TMD 1/1. mesto vezave	96
TIP F2d	AACAT(A/C)TC(A/C)GG(T/C)GG(T/C)CAT(G/T/C)T	TMD 2	48
TIP F3d	(A/C)ACAT(A/T/C)TC(A/T/C)GG(T/C)GG(A/T/C)CA(T/C)(G/T)T	TMD 2	432
TIP R1d	CCA(G/A)TGGTT(G/T)(G/T)CCCA(G/T/C)G(A/T)CCA	L 5	48
TIP R2d	GG(A/T/C)CC(A/C)(G/A)CCCA(G/A)TA(G/A)A(T/C)CCA	TMD 6	96
TIP R3d	GG(A/T/C)GC(G/A/C)(G/A)(G/C)CCA(G/A)TA(G/C)A(T/C)CCA	TMD 6	288

Osemnajst različnih kombinacij degeneriranih oligonukleotidov je bilo testiranih s pomočjo PCR v cikličnem termostatu Thermo Cycler (Applied Biosystem, ZDA) (Preglednica 10).

Reakcijska mešanica PCR je v končnem volumnu 50 μ l vsebovala:

- 100 ng genomske DNA,
- 10 x PCR pufer (Promega, ZDA),
- 2,5 mM $MgCl_2$,
- 200 μ M dNTP,
- 1 μ M koncentracije vsakega začetnega degeneriranega oligonukleotida,
- 1,5 enote GoTaq DNA-polimeraze (Promega, ZDA).

Pogoji pomnoževanja:

začetna 5-minutna denaturacija pri 95 °C,

35 ciklov s ponavljanjem: a) 1 minuta pri 95 °C,
 b) 1 minuta pri 45 °C,
 c) 2 minuti pri 72 °C,

zaključna 10-minutna elongacija pri 72 °C ter ohlajanje in vzdrževanje pri 4 °C.

Nespecifično pomnoževanje smo preverili s pripravo štirih različnih reakcijskih mešanic za vsako kombinacijo degeneriranih oligonukleotidov. Prva je vsebovala genomsko DNA fižola in oba začetna oligonukleotida, dve sta vsebovali genomsko DNA in enega od parov začetnih oligonukleotidov, zadnja pa je bila brez genomske DNA. Tako smo lažje določili specifične produkte PCR, ki so rezultat pomnoževanja fragmentov DNA z obema začetnima nukleotidoma ene kombinacije.

Produkti PCR so bili ločeni po dolžini na 1,2 % agarozni elektroforezi po postopku opisanem v poglavju 3.3.4.12.

Del gela s tarčnimi geni pričakovane dolžine smo s skalpelom izrezali iz agaroznega gela in očistili z GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, ZDA) po navodilih proizvajalca. Koščke gela smo prenesli v 1,5 ml mikrocentrifugirko znane mase in stekali, da smo dobili maso gela. Gel smo nato raztopili v razmerju 1 : 1 (volumen:masa) z vezavnim pufrom v vodni kopeli na 55 °C za 10 minut. 800 μ l raztopljenega gela smo prenesli na priloženo kolono in centrifugirali 1 min pri 10.000 g ter odlili supernatant. Usedlino smo dvakrat očistili s 500 μ l ledeno hladnega pufra za čiščenje in s centrifugiranjem ločili supernatant. Kolono z osušeno usedlino raztopljenega produkta PCR smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in dodali 50 μ l elucijske raztopine ter centrifugirali 1 min. Vzorec DNA smo shranili na -20 °C.

Koncentracijo fragmentov DNA smo izmerili s fluorometrom po postopku, opisanem v poglavju 3.3.4.1.

Za kloniranje smo izbrali sedem kombinacij začetnih oligonukleotidov s koncentracijo DNA večjo od 10 ng (2, 7, 11, 12, 13, 14, 16) (Preglednica 10). Produkta PCR, izolirane iz agaroznega gela, smo vključili v plazmid »pGEM-T Easy Vector« in transformirali v kompetentne celice bakterije *Escherichia coli* klon JM109 po navodilih komercialnega kompleta »pGEM-T Easy Vector System« (Promega, Madison, ZDA).

Preglednica 10: Seznam dolžin produktov fragmentov DNA in njihovih koncentracij, ki smo jih dobili z različnimi kombinacijami PIP in TIP začetnih oligonukleotidov. Z »*« so označeni vzorci, ki smo jih izbrali za kloniranje.

Table 10: List of DNA fragments length and their concentrations from different PIP and TIP primer combinations. Samples for cloning are marked with “*”.

Oznaka kombinacije	Smerni oligonukleotid	Protismerni oligonukleotid	Dolžina produkta	Koncentracija DNA v TE pufu (ng/μl)
1	PIP-F1	PIP-R1	500	24
			1000	27
2	PIP-F2	PIP-R2	300	31*
			500	9
			1000	7
3	PIP-F3	PIP-R3	500	43
4	PIP-F1	PIP-R2	400	41
			600	20
			700	8
5	PIP-F2	PIP-R3	500	34
6	PIP-F1	PIP-R3	500	28
7	PIP-F2	PIP-R1	800	56*
8	PIP-F3	PIP-R1	Ni produkta	
9	PIP-F3	PIP-R2	800	
10	TIP-F1	TIP-R1	400	
			600	39
11	TIP-F2	TIP-R2	500	15*
12	TIP-F3	TIP-R3	500	31*
13	TIP-F1	TIP-R2	600	33*
14	TIP-F2	TIP-R3	500	20*
			800	21
			1100	3
15	TIP-F2	TIP-R1	Ni produkta	
16	TIP-F3	TIP-R1	500	33*
17	TIP-F1	TIP-R3	600	4
18	TIP-F3	TIP-R2	500	46

Potrebno količino produkta PCR (Y) za ligacijo v plazmidno DNA smo izračunali po naslednji enačbi:

$$Y \text{ ng inserta} = \frac{50 \text{ ng vektor} * X \text{ kb insert}}{3.0 \text{ kb vektor}} * \frac{3}{1} \quad \dots (13)$$

Kot okvirno oceno smo upoštevali molarno razmerje med insertom (produktom PCR) in vektorjem (plazmid pGEM-T) glede na dolžino posameznega produkta PCR (X).

V ligacijsko mešanico smo dodali 5 μl ligacijskega pufra (2x Rapid Ligation Buffer, T4 DNA legaze), 1 μl pGEM-T vektorja (50 ng), 3 Weisssove enote T4 DNA ligaze in Y ng produkta PCR ter deionizirano vodo do končnega volumna 10 μl. Mešanico smo nežno premešali s pipeto in postavili čez noč v hladilnik, na 4 °C.

Iz mikrocentrifugirke smo odpipetirali 2 μl ligacijske mešanice in prenesli v novo 1,5 ml centrifugirko. Mešanici smo dodali 50 μl na ledu odtaljenih kompetentnih bakterijskih celic, nežno premešali in na ledu inkubirali 20 minut. Nato smo centrifugirke postavili za 48 sekund v vodno kopel, ogreto na 42 °C, s čimer smo povzročili temperaturni šok,

potreben za transformacijo. Bakterijsko mešanico smo ponovno inkubirali na ledu, 2 minuti, in dodali 950 µl tekočega LB-medija (20 g/l 1 dH₂O) (Sigma Aldrich). Stresali smo 2 uri na 150 rpm pri 37 °C, da se je vzpostavila ampicilinska odpornost. Po inkubaciji smo bakterije centrifugirali 10 minut pri 1000 g in odlili supernatant. Usedlino z bakterijami smo raztopili v 200 µl tekočega LB-medija. S tem smo koncentrirali število bakterij. Za vsak vzorec smo dvakrat po 100 µl bakterij razmazali po trdem LB-gojišču (35 g/l 1 dH₂O) (Sigma Aldrich), ki smo mu predhodno dodali 150 mg/l ampicilina ter 47,6 mg/l 0,2 mM IPTG (izopropil-β-D-tiogalaktozid) in 0,8 ml/l X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil β-D-galaktopiranozid) za modro-belo selekcijo. Bakterije smo gojili čez noč na 37 °C. Naslednji dan smo iz posamezne petrijevke odbrali bele bakterijske kolonije (uspela transformacija) in eno modro (neuspela transformacija), kot negativno kontrolo, ter jih prenesli v mikrotitrsko ploščo s 150 µl gojišča z ampicilinom (100 mg/l), ki je vseboval 90 % tekočega LB-medija in 10 % zamrzovalnega pufra (360 mM K₂HPO₄, 132 mM KH₂PO₄, 17mM Na-citrat, 4 mM MgSO₄, 68 mM (NH₄)₂SO₄, 44 % glicerol) (Sambrook in Russell, 2001). Posamezne bakterijske kolonije smo razmnožili čez noč pri 37 °C in jih do izolacije plazmidov hranili pri -80 °C.

Dan pred izolacijo plazmidov smo razmnožili posamezne bakterijske kloni. S sterilnim zobotrebcom smo prenesli posamezni klon v epruveto s 5 ml tekočega LB-medija z dodanim ampicilinom (100 mg/l). Čez noč smo bakterijske kloni inkubirali pri 150 rpm pri 37 °C. Izolacijo smo nadaljevali s komercialnim kompletom kemikalij »GeneJET Plasmid Miniprep Kit« (Thermo Scientific, ZDA), po opisanem postopku: prekonočno gojene bakterijske kulture smo centrifugirali pri 13.000 g 1 minuto in odstranili preostanek LB-medija. Bakterijski usedlini smo dodali 250 µl resuspenzijske raztopine in ga raztopili, da je nastala homogena suspenzija. Dodali smo 250 µl raztopine za razkroj celic in nežno mešali, dokler se suspenzija ni razbistrila. Po največ 5 minutah razkroja celic smo dodali 350 µl nevtralizacijskega pufra in nežno premešali. Nato smo centrifugirali 5 minut pri 12.000 g. Čisto raztopino lizata (700 µl) smo prenesli na priložene kolone in centrifugirali 1 minuto pri 12.000 g. Odpadek smo odlili, nato pa dvakrat zaporedoma sprali membrano kolone s 500 µl čistilne raztopine z etanolom in centrifugirali 1 minuto pri 12.000 g ter odlili odpadek. V zadnjem koraku smo prenesli kolono v svežo mikrocentrifugirko in dodali 50 µl TE pufra. Po 2-minutni inkubaciji na sobni temperaturi smo centrifugirali 2 minuti pri 12.000 g, da smo zbrali plazmidno DNA v mikrocentrifugirko. Očiščeno plazmidno DNA smo shranili pri -20 °C.

Plazmidno DNA bakterijskih klonov (30 µl) smo poslali na določanje nukleotidnih zaporedij s 3730xl DNA-analizatorjem pod »BigDye™ terminator cycling« pogoji z uporabo T7-univerzalnega oligonukleotida z enim prileganjem; v laboratorij podjetja Macrogen (Južna Koreja). Kot rezultat smo prejeli kromatografske datoteke tipa *.ab1.

Za analizo nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij smo uporabili različne računalniške programe in algoritme. Nukleotidna zaporedja smo prevedli v aminokislinska s programom Translate (ExPASy Proteomics Server). Za poravnavo nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij smo uporabili program ClustalX (Thompson in sod., 1997) in BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.1 (Hall, 1999). Podobnosti zaporedij z akcesijami v GenBank (NCBI) smo iskali z uporabo blastn, blastx in tblastx algoritmov (Altschul in sod., 1997) programskega paketa BLAST. Matriko za izdelavo dreves smo izdelali v ClustalX

programu (Thompson in sod., 1997) z Neighbour-Joining metodo s privzetimi parametri (Saitou in Nei, 1987) v MEGA 5.05. Za izris poravnave nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij smo uporabili program Boxshade 3.21.

Analiza izražanja genov akvaporinov

Za analizo izražanja akvaporinskih genov smo uporabili vzorce polno razvitih tretjih sestavljenih listov kontrolnih rastlin in rastlin izpostavljenih sušnemu stresu dveh različno tolerantnih starševskih linij navadnega fižola iz poskusa IJS 1. Ker so med našo raziskavo objavili 41 akvaporinskih sekvenc genov navadnega fižola (Ariani in Gepts, 2015), smo za analizo izražanja primerjali akvaporinske gene iz omenjene objave, s sekvencami AKP podobnih genov, ki smo jih izolirali iz rastlin sorte 'Tiber' z uporabo degeneriranih začetnih oligonukleotidov bombaža. Sekvence smo primerjali z uporabo filogenetskega drevesa računalniškega programa MEGA 7 (Kumar in sod., 2016). Pri izboru smo poleg podobnosti med izoliranimi in objavljenimi sekvencami AKP podobnih genov, ki smo jih pridobili iz podatkovnih baz Phytozome in GeneBank (Priloga C), upoštevali tudi objavljene rezultate vrednotenja podatkov izražanja sekvenc RNA v različnih organih divjih in kultiviranih fižolovih genotipov. Gena *PvPIP1;2* in *PvTIP1;1*, sta pokazala največjo povprečno vrednost izražanja v kontrolnih pogojih, gen *PvTIP1;1* pa je imel visoko izraženost tudi v sušnih pogojih (Ariani in Gepts, 2015). Za nadaljnje analize smo tako izbrali štiri akvaporinske gene iz TIP in PIP poddružin: *PvPIP1;2*, *PvPIP2;7*, *PvTIP1;1*, *PvTIP4;1*.

Pri analizi izražanja akvaporinskih genov smo uporabili referenčna gena: encim za razgradnjo inzulina, *IDE* (angl. insulin degrading enzyme), in *Ukn2* (neznani gen), ki sta bila izbrana zaradi najbolj stabilnega izražanja v listih med močnim sušnim stresom po 6, 8 in 10 dneh brez zalivanja – v primerjavi s kontrolo. Primernost uporabe teh dveh genov smo potrdili z algoritmoma geNorm in NormFinder (Borges in sod., 2012).

Sekvence dveh referenčnih in štirih akvaporinskih genov so bile določene in preverjene z računalniškima orodjema NCBI Blast ter Plant Ensembl. Začetni oligonukleotidi in sonde so bile pridobljene z uporabo Custom TaqMan® Expression Assays (Preglednica 11).

Preglednica 11: Referenčna gena (*IDE*, *Ukn2*) in štirje geni akvaporinov (*PvPIP1;2*, *PvPIP2;7*, *PvTIP1;1*, *PvTIP4;1*) s sekvencami začetnih oligonukleotidov ter sekvence MGB-sond. F – smerni oligonukleotid, R – protismerni oligonukleotid; MGB (angl. minor groove binder) sonda

Table 11: Two reference genes (*IDE*, *Ukn2*) and four aquaporin genes (*PvPIP1;2*, *PvPIP2;7*, *PvTIP1;1*, *PvTIP4;1*) with sequences of their respective primers and MGB-probes sequences. F – forward primer, R – reverse primer; MGB (minor groove binder) probe.

Ime	Tarčni gen	Nukleotidno zaporedje (5' - 3')	
<i>IDE</i>	Encim razgradnje inzulina	F:	CTAGAGAAACACAAAAATTTGAGG
		R:	GAAGA
		MGB-sonda:	TGCCTTAATGCTTCAACCTCATAGT CTGGCGAGAGATTAA
<i>Ukn2</i>	Neznan	F:	CCGTGGAGTTAATTAAGTGGGTGAA
		R:	GTTTCAAATGCTTGGGCAACTCA
		MGB-sonda:	ACCACCACAGTTTCAC
<i>PvPIP1;2</i>	Phavu_008G226000g	F:	GGAGTGGTGAAGGGTTTCGA
		R:	CAAGTCCGTCACCTTTTGTGTAC
		MGB-sonda:	CAATGCACCGAATCTG
<i>PvPIP2;7</i>	Phavu.009G118900g	F:	TCCGTGCGCTTTTCTACATTGTA
		R:	GCCGCTGAGGGAGTTGTA
		MGB-sonda:	CACCGCTGATAGCACC
<i>PvTIP1;1</i>	Phavu.001G181100g	F:	CCTCCTCCTGGCCTTCGT
		R:	TCCAGCTGAGAGTCCAAATGC
		MGB-sonda:	CTCCTCCACTGTTCCC
<i>PvTIP4;1</i>	Phavu.009G108800g	F:	GGACAGAAAACCTCCGTTTCATACG
		R:	AAGGTCAACACAATCTCCCAAATCA
		MGB-sonda:	CCCCTTGACCATACCC

Za analizo izražanja izbranih genov smo uporabili metodo PCR v realnem času – qPCR (angl. real-time polymerase chain reaction). RNA smo izolirali iz listnega tkiva po postopku, opisanem v poglavju 3.3.4.2. Pri preverjanju prisotnosti DNA v vzorcih RNA smo z uporabo 18S-tarče s qPCR (Thermo Fischer Scientific, ZDA) zasledili prisotnost ostankov DNA. Vzorce RNA smo zato ponovno očistili z uporabo DNaze (TURBO DNA-free™ Kit, Thermo Fischer Scientific, ZDA), po navodilih proizvajalca. Iz 2 µg RNA so bile narejene tri ponovitve sinteze cDNA. Za prepis smo uporabili komplet reagentov SuperScript III Reverse Transcriptase (Thermo Fischer Scientific, ZDA) z naključnimi začetnimi oligonukleotidi, ki omogočajo prepisovanje celotnega zaporedja matrične RNA. Reakcijska mešanica 1 za prepis v cDNA je v končnem volumnu 13 µl vsebovala: 2 µg RNA, 500 ng/µl Oligo(dT)12-18-A, 1 µl 10 mM dNTP in deionizirano vodo do končnega volumna. Reakcijsko mešanico smo inkubirali 5 min na 65 °C in nato 1 min na ledu. Reakcijski mešanici 1 smo nato dodali mešanico 2 v končnem volumnu 6 µl, ki je vsebovala: 5X First-Strand Buffer, 0,1 M DTT in deionizirano vodo do končnega volumna. Na koncu smo v vsak vzorec dodali še 1 µl Superscript III RT (200 U/µl). Inkubacija reakcijske mešanice je potekala 1 uro pri 50 °C, nato 15 min pri 70 °C v cikličnem termostatu Verity (Applied Biosystems, ZDA). Triplikati cDNA so bili združeni in uporabljeni v reakcijski mešanici qPCR, ki je vsebovala: 10 µl TaqMan Universal Master MIX II (Applied Biosystems, ZDA), 1 µM smerni in protismerni začetni oligonukleotid, 0,2 µM sondo in 2 µl cDNA. Vsak vzorec je bil analiziran v treh tehničnih ponovitvah. Na vsako ploščo (MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plates, Applied Biosystems, ZDA) smo vključili kontrolo brez cDNA in negativno kontrolo, cDNA-krompirja, za preverjanje odstopanj med ploščami. Plošče smo prekrili s posebnim optičnim filmom (MicroAmp Optical Adhesive Film, Applied Biosystems, ZDA). Reakcija qPCR, s končnim volumnom

20 µl, je potekala na aparatu 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, ZDA). Vsak nov krog pomnoževanja se je začel z 2 minutama pri 50 °C in nato z 10 minutami pri 95 °C, v nadaljevanju je sledilo 40 ciklov s ponavljanjem 15 sekund pri 95 °C in 1 minuto pri 60 °C. Pridobljene podatke smo normalizirali na referenčno barvilo z uporabo računalniškega programa 7500 (Applied Biosystems, ZDA). Izhodišče in mejne vrednosti so bile vnesene ročno, CT-vrednosti so bile izračunane s pomočjo računalniškega programa. Učinkovitost reakcije qPCR je bila izračunana za vsak gen posebej, s pomočjo standardne krivulje, narejene iz vzorcev različnih koncentracij (1; 0,1 in 0,01) združene cDNA. Primernost referenčnih genov smo določili z uporabo GeNorm-algoritma pri 0,037 M stabilizacijski vrednosti. Povprečna stopnja izražanja referenčnih genov je bila uporabljena za normalizacijo izražanja vzorcev v analizi (Vandesompele in sod., 2002). Rezultati za vsa štiri obravnavanja so bili izračunani za vsak dan vzorčenja relativno na kontrolo Tibra z uporabo metode $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak in Schmittgen, 2001). Metoda poda oceno genskega izražanja ob predpostavki 100 % PCR učinkovitosti tarčnih in referenčnih genov. Uspešnost pomnoževanja zelenega fragmenta smo preverili na 1,4% agaroznem gelu. Statistično značilne razlike v izražanju genov med starševskima linijama, med obravnavanji in interakcije med sorto ter obravnavanji so bile določene z dvosmerno ANOVA.

3.3.4.11 Analiza vpliva suše na izražanje genov, ki kodirajo proteaze, pri starševskih linijah

Analizo izražanja genov proteaz smo opravili na polno razvitem tretjem sestavljenem listu kontrolnih rastlin in rastlin, izpostavljenih suši obeh različno tolerantnih starševskih linij iz poskusa BF 2. Za analizo smo uporabili začetne oligonukleotide dveh na novo identificiranih serinskih proteaz, PvSLP1 (*P. vulgaris* subtilizinu podobna proteaza 1) in PvSLP2 (*P. vulgaris* subtilizinu podobna proteaza 2), ter tri referenčne gene, *EF1*, *CYP* in *GAPC2*, ki so jih uporabili Budič in sod. (2013) pri analizi izražanja v navadnem fižolu sorte Zorin (Preglednica 12). Sonde so bile kovalentno označene na 5'-terminalnem nukleotidu s FAM- (6-karboksifluorescein) barvo receptorja in na 3'-terminalnem nukleotidu s TAMRA- (tetrametil-6-karboksirodamin) barvo dušilca.

Za analizo izražanja izbranih genov smo uporabili metodo PCR v realnem času. RNA smo izolirali iz listnega tkiva po postopku opisanem v poglavju 3.3.4.2. Analiza s pomočjo PCR v realnem času je bila izvedena po enakem postopku, kot je opisana v poglavju 3.3.4.10. Na podlagi stabilizacijske vrednosti in nezaznanega signala gena *CYP* pri vzorcih v 4. dnevni suši smo za nadaljnjo analizo uporabili referenčna gena *EF1* in *GAPC2*, referenčni gen *CYP* smo izločili. Statistično značilne razlike v izražanju genov vsake starševske linije v sušnem stresu so bile določene z enosmerno ANOVA.

Preglednica 12: Sekvence homolognih začetnih oligonukleotidov in sond genov dveh subtilaz (*PvSLP1*, *PvSLP2*) ter treh referenčnih genov (*EF1*, *Cyp*, *GAPC2*). F – smerni oligonukleotid, R – protismerni oligonukleotid; ime sonde je ime tarčnega gena z barvo receptorja FAM (6-karboksifluorescein) na 5'-koncu začetnega oligonukleotida in barvo dušilca TAMRA (6-tetrametil-karboksi-rodamin) na 3'-koncu začetnega oligonukleotida. EF1 – elongacijski faktor 1; Cyp – citokrom P450; GAPC2 – gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze.

Table 12: Sequences of homologous primers and probes of two subtilase genes (*PvSLP1*, *PvSLP2*), and three reference genes (*EF1*, *Cyp*, *GAPC2*). F – forward primer, R – reverse primer. Name of the adapter is the name of target gene with receptor color FAM (6-carboxyfluorescein) at the primer 5'-end and quencer color TAMRA (6-tetramethyl-carboxy-rhodamine) at the primer 3'-end. EF1 – elongation factor 1; Cyp – Cytochrome P450; GAPC2 – glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

Ime tarčnega gena	Nukleotidno zaporedje (5' - 3')
<i>PvSLP1</i>	F: tagctgcgggggtatttaac R: gagcattccacttgcttcc
<i>FAM-PvSLP1</i>	FAM- agatgggcatgggagtcatacagcc-TAMRA
<i>PvSLP2</i>	F: cctgcggctattaagtctgc R: gccagggttaagagccctat
<i>FAM-PvSLP2</i>	ccgtttactcatgggctgggtca
<i>EF1</i>	F: cttgctttcacccttggtgt R: tctgggttgtaaccaaccttc
<i>FAM-EF1</i>	FAM-tgttgctgtaacaagatggatgcca-TAMRA
<i>Cyp</i>	F: ggatcgatcttccatcgtgt R: tagatcgactcgctcctgt
<i>FAM-Cyp</i>	FAM- tcattgtgccaggcggtgac-TAMRA
<i>GAPC2</i>	F: tcccatgtttgtgtgtgtg R: tggatcatcaaacctcaaca
<i>FAM-GAPC2</i>	FAM-tgccttgctccactcgccaa-TAMRA

3.3.4.12 Ločevanje pomnoženih fragmentov DNA

Pomnožene fragmente vzorcev DNA starševskih linij in RIL smo analizirali najprej z elektroforezo na agaroznem gelu, kjer pa smo potrebovali večjo ločljivost med produkti, smo uporabili kapilarno elektroforezo QIAxcel® Advanced (QIAGEN®) ali sekvenčno napravo ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ZDA).

Horizontalno gelsko elektroforezo Gibco BRL Sunrise™ 96 (Life Technologies, ZDA) smo pripravili z 1,4–2% agaroznim gelom (Top Vision™ LM GQ Agarose; Fermentas, Litva) v 0.5 × TBE pufru (44,5 mM tris, 44,5 mM borna kislina, 1 mM EDTA) in mu dodali 1–1,5 µl etidijevega bromida s koncentracijo 0,5 µg/ml. V posamezni žepek agaroznega gela smo dodali 5 µl mešanice: 3 µl vzorca produkta PCR in 2 µl modrega barvila (12,5 % (w/v) Ficoll tip 400; 0,2 % (w/v) brom fenol modro). Poleg vzorcev smo na gel nanesti tudi lestvico fragmentov nukleinskih kislin (O'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder; Fermentas, Litva). Postopek ločevanja je potekal 90 minut pri 80–100 V. Pomnožene fragmente DNA smo zaznali s transiluminatorjem MacroVue™ UV (Amersham Pharmacia Biotech, Upssala, Švedska). Slike smo posneli s polaroidnim fotografskim aparatom MP-4 (Polaroid, Cambridge, ZDA).

Za analizo dolžin fragmentov DNA do 5 bp natančno, smo uporabili kapilarno elektroforezo QIAxcel® Advanced (QIAGEN®, ZDA), ki nudi hitro in popolnoma avtomatizirano analizo produktov PCR. Pri tej analizi smo uporabili 15 µl označevalca

analitskega razpona s 15 bp in 3 kbp dolgima fragmentoma za normalizacijo posameznih vzorcev ter aparaturi namenjene standardne označevalce Qiagen (100 bp–2,5 kbp ali 25–500 bp), ker so velikosti in koncentracije njihovih fragmentov že vnesene v program QIAxcel Screen Gel Software. Za analizo smo potrebovali 10 µl vzorca, med analizo pa smo ga porabili samo 0,1 µl. V aparaturu smo previdno vstavili kartušo s čipom in nastavili metodo analize OM500, ki označuje visoko ločljivost s srednjo koncentracijo DNA s 500, sekundnim ločevanjem vzorcev v kapilari. Dobljene podatke smo obdelali s pomočjo programa QIAxcel Screen Gel in BioCalculator software.

Pri produktih PCR, kjer je bila za analizo dolžinskih polimorfizmov mikrosatelitnih markerjev potrebna večja natančnost, do 3 bp, smo analizo opravili s sekvenčno napravo ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ZDA), ki omogoča avtomatsko lasersko detekcijo in deluje po principu kapilarne elektroforeze. Za to analizo je posamezni vzorec vseboval naslednje sestavine: 12 µl formamida, 1 µl dolžinskega markerja GeneScan 350 ROX Size Standard (Applied Biosystems, ZDA) ter po 1 µl treh produktov PCR z različnimi fluorescentnimi oznakami (FAM, HEX ali TAMRA) in/ali dolžinami. Elektroforetsko ločevanje fragmentov je potekalo v 47 cm dolgi kapilari z gelom POP-4 (Performance Optimized Polymers), ki je primerna za analizo mikrosatelitov. Za odčitavanje dolžin markerjev SSR smo uporabili računalniški program Gene Scan™3.7.

3.4 STATISTIČNA ANALIZA

Podatke, ki smo jih pridobili iz poskusov, smo zbrali in uredili v programu Microsoft Excel 2010. Opisno statistiko ali univariatno analizo podatkov ter analizo dveh spremenljivk oz. bivariatno analizo smo opravili s programoma GraphPad Prism 5.02 (San Diego Kalifornija, ZDA), multivariatne analize pa s statističnim programom Statgraphic XVI (StatPoint Technologies, Inc 2009).

Na osnovi popisa kategoričnih morfoloških znakov smo naredili tabelo, ki jo določajo vrednosti spremenljivke, in izračunali pripadajoče frekvence. Za proučevane rastline RIL smo izračunali povprečje, minimalno in maksimalno vrednost, standardni odklon ter koeficient variacije, ki omogoča primerjavo variabilnosti dveh spremenljivk. Povezanost spremenljivk smo izračunali s Pearsonovim koeficientom korelacije. Za izračun statističnih razlik med povprečji numeričnih lastnosti, na katere lahko vpliva suša, smo uporabili Fisher-jev test najmanjših značilnih razlik (LSD).

Fiziološke parametre smo pri 95% stopnji zaupanja analizirali z dvosmerno analizo varianc (ANOVA). Rezultati meritev so prikazani v preglednicah ali grafikonih kot povprečne vrednosti s $\pm$ standardno napako. Statistično značilne razlike smo označili s črkami. Obravnavanja, označena z različnimi malimi črkami, se med seboj statistično značilno razlikujejo (a, b, c ..., f). Obravnavanja, pri katerih nismo ugotovili statistično značilne razlike, so označena z enako črko.

Z namenom, da bi ugotovili, katere kombinacije morfoloških, fenoloških in fizioloških lastnosti ter količine pridelka oziroma katere spremenljivke določajo največjo variabilnost naših podatkov, smo uporabili analizo glavnih komponent – PCA (angl. Principal

components analysis) in linearno diskriminantno analizo (LDA). Vrednosti opisnih spremenljivk smo spremenili v številske, vendar so glede na urejenost še vedno ostale opisne.

3.5 GENSKO KARTIRANJE IN ANALIZA QTL

3.5.1 Analiza vezanosti markerjev (gensko kartiranje)

Analizo vezanosti različnih markerjev smo izvedli s pomočjo računalniškega programa JoinMap 4.0 (Plant Research International B. V.) (Van Ooijen, 2006). Uporabili smo podatke populacije križancev dveh homozigotov oz. čistih linij sorte 'Tiber' in sorte 'Starozagorski črn' ter 82 rekombinantnih inbridiranih linij, pridobljenih z metodo SSD (Zupin in sod., 2014; Šuštar-Vozlič in sod., 2015).

Rezultate genotipizacije mikrosatelitov in markerjev AFLP vsake analizirane RIL smo razdelili v dve skupini: glede na prisotnost namnoženega fragmenta le pri materini liniji ('Tiber') ali očetni liniji ('Starozagorski'). V kartiranje smo vključili tudi štiri kvalitativne lastnosti, pri katerih sta se starševski liniji razlikovali, in sicer barva cveta, barva stebela ter tip rasti. Za vsako RIL smo polimorfizme molekulskih markerjev in morfoloških lastnosti označili z veliko tiskano črko glede na lastnost starševskih linij. Z »A« smo označili lastnost, ki je bila dedovana po sorti 'Tiber', in z »B« lastnost, dedovano po sorti 'Starozagorski'. Manjkajoče podatke smo označili z znakom »-«.

Pripravljeno tabelo s podatki o populaciji, številu vrednotenih RIL in številu uporabljenih markerjev smo vnesli v program, ki dane podatke razporedi v zavihke, kjer lahko po potrebi naknadno izločimo izbrano RIL ali marker. Prva analiza kartiranja je test segregacije, kjer nam rezultat analize pokaže frekvenco genotipa za vsak marker s χ^2 -testom za segregacijo glede na pričakovano stopnjo dedovanja dane klasifikacije po Mendelovih zakonih. Program markerje razporedi po skupinah v tako imenovano drevo glede na izbrani parameter (ocena neodvisnosti LOD, test neodvisnosti (p-vrednost), frekvenca rekombinacije ali vezanost LOD) in mejne vrednosti, ki jih lahko določimo v nastavitvah. Podatke smo razvrstili v vezane skupine na osnovi ocene neodvisnosti LOD, ki temelji na G^2 -statistiki za neodvisnost v dvosmerni kontingenčni tabeli:

$$G^2 = 2 \sum O \log\left(\frac{D}{E}\right) \quad \dots (14)$$

D je dejansko in E pričakovano število vzorcev v celici, $\log$ naravni logaritem in Σ vsota vseh celic.

Na test neodvisnosti ne vpliva segregacijski odklon – kot na oceno vezanosti LOD, kar povzroči manjšo pojavnost lažnih povezav. G^2 -statistiko za neodvisnost v dvosmerni kontingenčni tabeli lahko primerjamo s χ^2 -razporeditvijo s prilegajočimi stopnjami prostosti za pridobitev p-vrednosti.

Frekvenca rekombinacije dveh parov markerjev je ocenjena z maksimalno verjetnostjo z uporabo Brentove številčne metode (Maliepaard in sod. 1997). Spodnja mejna vrednost

intervala ocene neodvisnosti LOD je bila 3,0, zgornja 10,0 s korakom 1,0. V analizi smo izbrali vrednost $LOD \geq 3,5$, kjer lahko z dovolj veliko gotovostjo predvidevamo, da med dvema lokusoma obstaja povezava. Za vsak marker pridobimo podatek najmočnejše navzkrižne vezave (angl. strongest cross link – SCL-value), ki nam pove, s katerim markerjem iz sosednje vezane skupine je najmočnejše povezan. Ta vrednost nam pomaga pri naknadnem uvrščanju nerazporejenih markerjev v že sestavljene skupine. S klikom na določeno skupino dobimo podatke slabe, dobre in maksimalne povezave med markerji v izbrani vezani skupini, ki nam pomaga pri nadaljnjem oblikovanju skupin. Z izborom parametrov smo stremeli k temu, da je število vezanih skupin enako ali blizu številu kromosomov navadnega fižola.

Razdalje na genski karti smo izračunali s funkcijo Kosambi za pretvorbo frekvence rekombinacije med markerji v centimorgane (cM), ki predpostavlja določeno stopnjo interference:

$$x = \frac{1}{4} \ln \left[\frac{(1+2r)}{(1-2r)} \right] \quad \dots (15)$$

x je razdalja na karti, r pa frekvenca rekombinacije.

Razvrščanje parov markerjev smo izvedli, ko je bila vrednost $LOD \geq 1,0$ in rekombinacijska frekvenca manjša od 0,4. Z vsakim dodanim markerjem je bil optimalni razpored markerjev določen s ponovnim razporejanjem in pragom »skok funkcije« (angl. jump), enakim ali večjim od vrednosti 5,0. Nastavitev *jump* pomeni mejno vrednost, tj. za koliko se vrednost testa χ^2 še lahko spremeni ob dodanem novem markerju, pri čemer ostane statistična značilnost genske karte v mejah pričakovanega. Končna karta je bila preračunana z metodo najmanjših kvadratov (Stam, 1993). Markerje smo razvrstili v skupine v dveh krogih. V prvih dveh so markerji razporejeni glede na mejne vrednosti LOD in frekvence rekombinacije, v tretjem krogu pa je dodajanje markerjev brez statističnih omejitev.

Razporejenost markerjev smo primerjali z že objavljenimi podatki v literaturi (Grisi in sod., 2007; Blair in sod., 2006, 2008; Perez-Vega in sod., 2010; Hanai in sod., 2010; Galeano in sod., 2011; Chen in sod., 2014). Vezane skupine smo oštevilčili po standardni nomenklaturi Pedrosa-Harand in sod. (2008). Če so bili markerji pri nas v ločenih skupinah, v literaturi pa v isti, smo skupine ločili s črkami (npr. 1a in 1b). Vezani skupini 12 in 13 smo preimenovali v skupini x1 in x2.

Povprečni interval med markerji na karti smo izračunali po formuli:

$$\bar{x} = \frac{1}{L} \sum_{l=1}^L \frac{D_l}{(N_l-1)} \quad \dots (15)$$

x je povprečna razdalja med markerji, L število vezanih skupin markerjev, N_l število markerjev v l -vezanih skupinah markerjev in D_l dolžina vezane skupine markerjev z oznako l .

3.5.2 Analiza QTL

Lokuse kvantitativnih lastnosti smo na genski karti določili z računalniškim programom Windows QTL Cartographer 2.5 (Wang in sod., 2012). V program smo vnesli osnovne podatke o populaciji križanja in vstavili podatke vezanih skupin z markerji ter pripadajočimi razdaljami (cM). V analizo smo vključili tudi podatke kvantitativnih lastnosti, ki smo jih uredili po oznaki RIL in obeh poskusih, BF ter KIS (Priloga D). Po izpolnjenih šestih korakih, ki jih zahteva program, smo mejne vrednosti izračunali z nastavitvijo 1000 permutacij pri 95 % stopnji zaupanja. Podatke vseh vezanih skupin in vseh kvantitativnih lastnosti smo analizirali z metodo kompozitnega intervalnega kartiranja – CIM (angl. composite interval mapping) s hitrostjo premikanja 2 cM. Za kontrolo variacije drugih regij genoma, ki lahko vplivajo na detekcijo QTL, smo določili kofaktorje z uporabo standardnega modela CIM-analize s kontrolnim številom markerjev 5 v okviru 10 cM z metodo najmanjših kvadratov.

4 REZULTATI

4.1 KARAKTERIZACIJA RASTLIN STARŠEVSKIH LINIJ

4.1.1 Vrednotenje morfoloških, fenoloških lastnosti in pridelka

Z namenom ugotoviti razlike med starševskima linijama, smo sorti 'Tiber' in 'Starozagorski' okarakterizirali z morfološkimi, fenološkimi lastnostmi in vrednotili količino pridelka. Skupaj smo ovrednotili štirinajst morfoloških lastnosti (oblika brakteole, velikost brakteole, barva jadra, žilnatost jadra, barva stebila, tip rasti, oblika lista, dlačice na zgornji ploskvi lista, pozicija kljuna, ukrivljenost stroka, barva svežega stroka, oblika semena, barvni vzorec semena in osnovna barva semena) petih rastlinskih organov (cvet, steblo, list, strok, seme) in dve fenološki lastnosti (število dni do cvetenja, število dni do pojava strokov) ter tri parametre količine pridelka (število strokov na rastlino, število semen na strok, masa 100 semen (g)) (Preglednica 13). Vseh naštetih lastnosti, razen pridelka, nismo vrednotili v poskusih karakterizacije starševskih linij. Za boljšo primerjavo numeričnih lastnosti s potomci starševskih linij so v preglednici 13 prikazani rezultati parametrov iz poskusov v rastlinjaku na BF in KIS, kjer smo istočasno vrednotili tudi rastline RIL.

Preglednica 13: Morfološke in fenološke lastnosti ter količina pridelka navadnega fižola sorte 'Tiber' in 'Starozagorski črn'. II – neomejena pokončna grmičasta oblika rasti, III – neomejena neplezalna in polplezalna oblika rasti (Singh, 1991); »*« – lastnosti, v katerih se sorta 'Tiber' in sorta 'Starozagorski' razlikujeta.

Table 13: Morphological, phenological traits and yield of two common bean cultivars, 'Tiber' and 'Starozagorski črn'. II – indeterminate upright bush growth habit, III – indeterminate prostrate non-climbing and semi-climbing bush growth habit (Singh, 1991); »*« – traits that differ cultivars 'Tiber' and 'Starozagorski'.

Rastlinski organ	Lastnost	Obravnavanje	'Tiber'		'Starozagorski'	
			KIS	BF	KIS	BF
Cvet	Št. dni do cvetenja		26–27	38	28–29	38
	Oblika brakteole		Srčasta		Srčasta	
	Velikost brakteole		Majhna		Majhna	
	Barva jadra*		Bela		Vijolična	
	Žilnatost jadra		Gladko		Gladko	
Steblo	Barva*		Zelena		Zelena z vijoličnimi progami	
	Tip (oblika) rasti*		III		II	
Listič	Oblika		Jajčasta		Jajčasta	
	Dlačice na zgornji ploskvi		Redke in kratke		Redke in kratke	
Strok	Št. dni do pojava strokov		32	42	33–34	46
	Pozicija kljuna		Hrbtna		Hrbtna	
	Ukrivljenost		Nekoliko ukrivljen		Nekoliko ukrivljen	
	Barva svežega stroka*		Zelena		Zelena z vijoličnimi progami	
	Št. strokov na rastlino	Kontrola	6,1	6,3	7,4	1,5
		Suša	4,8	1,1	3,9	0
	Št. semen na strok	Kontrola	3,2	1,2	2,7	1,4
		Suša	3,1	1,5	2,5	0
Seme	Oblika		Ledvičasta		Ledvičasta	
	Barvni vzorec		Brez vzorca		Brez vzorca	
	Osnovna barva*		Bela		Črna	
	Masa 100 semen (g)	Kontrola	39,97	29,02	40,03	20,10
		Suša	38,60	18,24	39,11	0

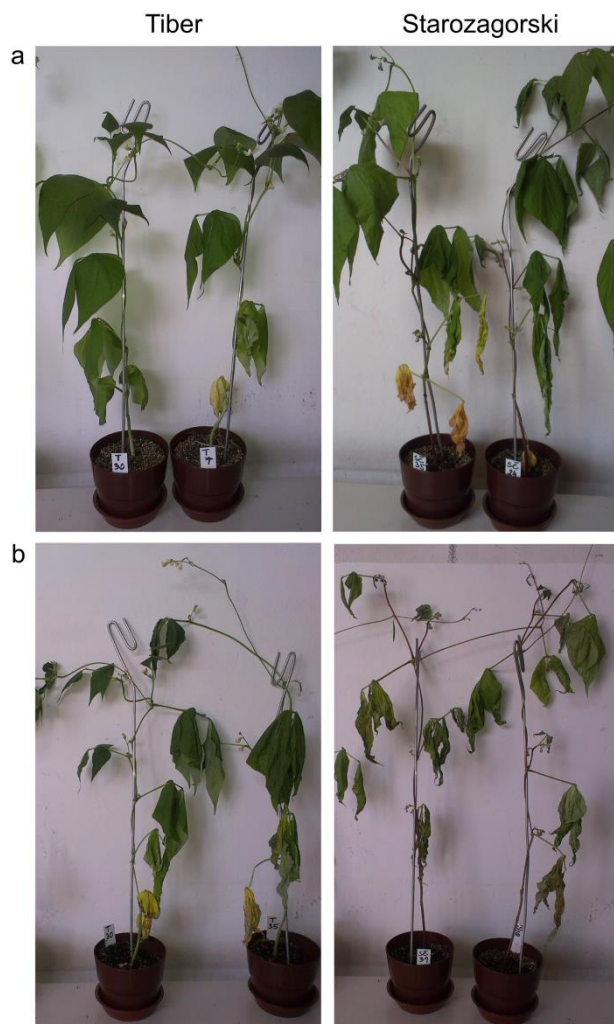
Po vrednotenju morfoloških, fenoloških podatkov in podatkov o količini pridelka smo ugotovili, da se sorti 'Tiber' in 'Starozagorski' razlikujeta v petih lastnostih, in sicer v barvi jadra, barvi stebila, barvi semena, tipu rasti, barvi svežega stroka (v preglednici označeno z »*«). V številu dni do cvetenja, številu dni do pojava strokov, številu strokov na rastlino, številu semen na strok in masi 100 semen se starševski liniji statistično značilno ne razlikujeta.

4.1.2 Vrednotenje fizioloških lastnosti

V poskusu karakterizacije starševskih linij smo sušni stres ustvarili tako, da smo rastline tik pred začetkom cvetenja (21. dan rasti) prenehali zalivati. Za spremljanje stopnje sušnega stresa smo skozi celoten poskus spremljali vsebnost vode v substratu (VVS) z vsakodnevnim tehtanjem loncev. Rezultati iz poskusov karakterizacije starševskih linij so bili podobni, saj smo meritve in vzorčenja izvedli glede na VVS. V nadaljevanju so predstavljeni rezultati VVS in fizioloških meritev iz poskusa IJS 2. Povprečne vrednosti $\pm$ standardno napako in statistično značilne razlike fizioloških parametrov med starševskima linijama ter med obravnavanji iz poskusa IJS 2 so prikazane v prilogi E. Odvisnost RVV in VP od VVS, poskusov IJS 1 ter BF_{SL}, je prikazana v prilogi F in prilogi G.

Na začetku rasti rastlin navadnega fižola smo v litrskih loncih s starševskima linijama pri poskusu IJS 2 vzdrževali VVS od 50 do 58 vol%. Skozi poskus smo uspeli vzdrževati VVS kontrolnih rastlin (K) v razponu od 43,1 do 57 vol% (Slika 11a). Kontrolne vrednosti med starševskima linijama so se povprečno razlikovale za 5,8 vol%, a razlike niso bile statistično značilne. Dnevi suše so vplivali na VVS. V prvih štirih dneh suše se je VVS zmanjšala za dobrih 10 % pri obeh starševskih linijah, kasneje pa se je pri sorti 'Tiber' na dan zmanjšala za 4,2 %, pri sorti 'Starozagorski' pa za 1,9 %. Statističnih razlik pri VVS pri rastlinah, izpostavljenih suši (S), med starševskima linijama ni bilo ($p > 0,05$). Značilne razlike med povprečnimi vrednostmi VVS med rastlinami K in S so se prvič pokazale v četrtem dnevu suše ($p < 0,05$), ko se je VVS zmanjšala za 35,8 % pri sorti 'Tiber' in za 52,1 % pri sorti 'Starozagorski' v primerjavi s kontrolo. Sedmi dan suše je znašala VVS pri sorti 'Tiber' povprečno 26,7 vol% in pri sorti 'Starozagorski' 24 vol%. Zadnji dan meritev (11. dan) je bila povprečna VVS pri obeh starševskih linijah podobna, in sicer dobrih 22 vol% (Slika 11a). Po sedmem dnevu suše smo tri rastline vsake starševske linije ponovno zalivali vsak dan, do 11. dne (11R), ko so dosegle VVS 41,7–62,3 vol%.

Slika 10 prikazuje odziv rastlin navadnega fižola sorte 'Tiber' in 'Starozagorski' v S1 (VP = -0,5 – -1,0 MPa) in S2 (VP = -1,5 – -2,0 MPa).

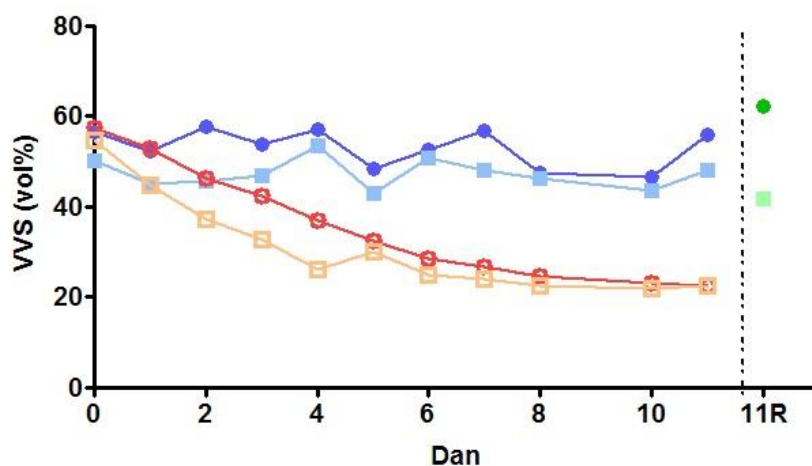


Slika 10: Odziv rastlin navadnega fižola sorte 'Tiber' in 'Starozagorski črn' v suši 1 (a) in v suši 2 (b).
Figure 10: Response of common bean cultivars 'Tiber' and 'Starozagorski črn' at drought 1 (a) and drought 2 (b).

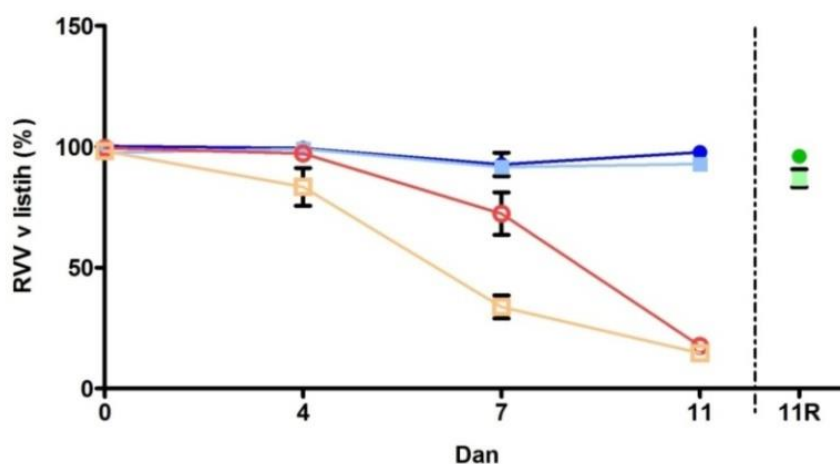
Povprečna relativna vsebnost vode (RVV) v listih kontrolnih rastlin fižola je bila skozi celoten poskus 95–97,4% pri obeh starševskih linijah (Slika 11b). Četrty dan suše so se statistične razlike med rastlinami S in K že pokazale ($p < 0,05$), a samo pri sorti 'Starozagorski', kjer je bila RVV za 12,5 % manjša od kontrolne vrednosti, RVV v listih sorte 'Tiber' je ostala še enaka kontrolnim vrednostim. Sedmi dan suše so se razlike v RVV pokazale tudi pri sorti 'Tiber' ($p < 0,01$), saj je bila RVV v listih rastlin v suši 25,7 % nižja v primerjavi z RVV rastlin K. Pri sorti 'Starozagorski' je RVV padla na 33,7 %, kar pomeni, da se je zmanjšala za 64,6 % ($p < 0,001$). Statistično značilne razlike med starševskima linijama v suši so bile sedmi dan pri 99,0 % stopnji zaupanja. Enajsti dan suše je bila RVV v listih sorte 'Tiber' 16,7%, v listih sorte 'Starozagorski' pa 14,0%. Značilnih razlik med starševskima linijama v S3 ni bilo. Rehidrirane rastline so 4 dni po ponovnem zalivanju pri sorti 'Tiber' dosegle povprečno 96,65 %, pri sorti 'Starozagorski' pa 87,0 % RVV v listih.

Pri kontrolnih vrednostih se je vodni potencial (VP) skozi poskus pri vseh rastlinah povprečno gibal od -0,16 do -0,27 MPa (Slika 11c). Statistično značilne razlike med rastlinami K in S so se pokazale pri sorti 'Starozagorski' že četrti dan suše ($p < 0,01$), sedmi in enajsti dan pa pri obeh starševskih linijah. Med rastlinami starševskih linij, izpostavljenimi suši so bile značilne razlike četrti ($p < 0,05$) in sedmi dan suše ($p < 0,01$). Enajsti dan suše značilnih razlik med rastlinami v suši ni bilo. Vrednosti VP so pri obeh starševskih linijah v S3 padle pod -2,5 MPa. Rehidrirane rastline obeh starševskih linij so enajsti dan dosegle VP kontrolnih rastlin.

a)

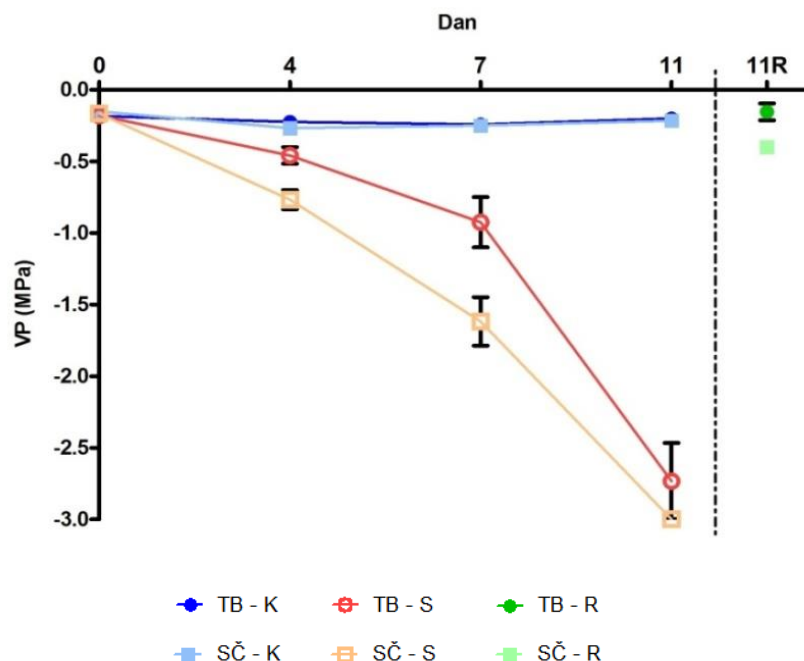


b)



Slika 11 se nadaljuje (legenda na naslednji strani).

c)



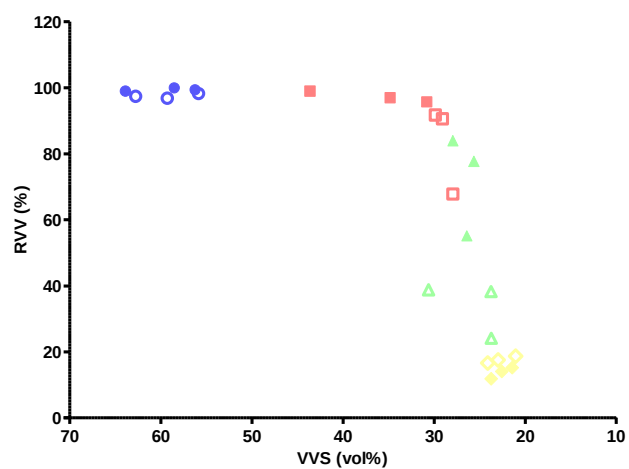
Slika 11: Prikaz vsebnosti vode v substratu in rastlinah sorte 'Tiber' ter 'Starozagorski črn' pred sušo, v treh časovnih stopnjah suše in v rehidraciji. Prikazane so povprečne vrednosti treh ponovitev na obravnavanje in njihove $\pm$ standardne napake; a) povprečna vsebnost vode v substratu (VVS), b) relativna vsebnost vode v listih (RVV), c) vodni potencial (VP), K – kontrola, S – suša in R – rehidracija.

Figure 11: Soil water content and relative water content in plants of two cultivars, 'Tiber' and 'Starozagorski črn', before drought, at three time-stages of drought and at rehydration. Data are means of three plants with their $\pm$ standard error. a) average substrat water content (VVS), b) relative water content in leaves (RVV), c) water potential (VP), K – control, S – drought, R – rehydration.

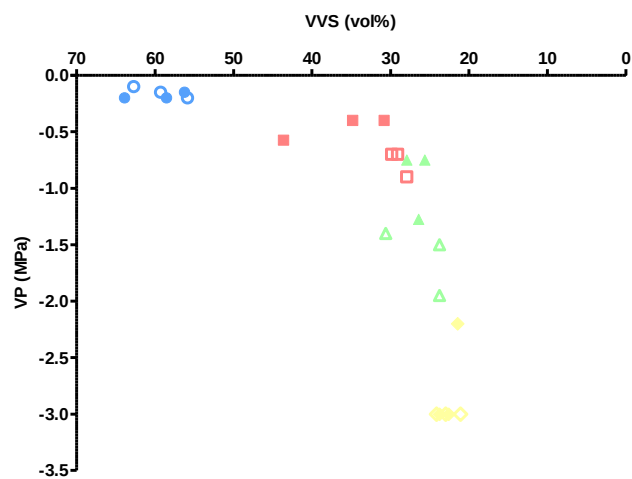
Pri povezavi med VVS in RVV v listih se je izkazalo, da se do 35 vol% VVS RVV povprečno bistveno ne spremeni, saj je RVV obeh starševskih linij še nad 90 % (Slika 12a). Kasneje vsebnost vode v listih drastično pade. Pri 22–24 vol% vode v substratu je v tretjih polno razvitih sestavljenih listih že manj kot 20 %. Velik odziv rastlin v prvih dneh suše se je pokazal pri meritvah vodnega potenciala (VP). Povezava med VVS in VP kaže, da se je že med 45 in 30 vol% VVS VP znižal za 116 % pri sorti 'Tiber' ($-0,46 \pm 0,06$ MPa), pri sorti 'Starozagorski' pa za 244 % ($-0,77 \pm 0,07$ MPa) (Slika 12b). Kasneje se je tudi pri VP pokazalo drastično zmanjšanje in pri 20 vol% VVS ga ni bilo mogoče več izmeriti ($VP < -3$ MPa).

Vpliv vsebnosti vode v listih na vodni potencial kaže, da se v prvih 20 % izgube vode v listih VP postopno znižuje do $-0,7$ MPa, kasneje pa se z vsebnostjo vode v listih začne močno zniževati tudi VP in pri 24 % RVV pade na skoraj $-2,0$ MPa (Slika 12c).

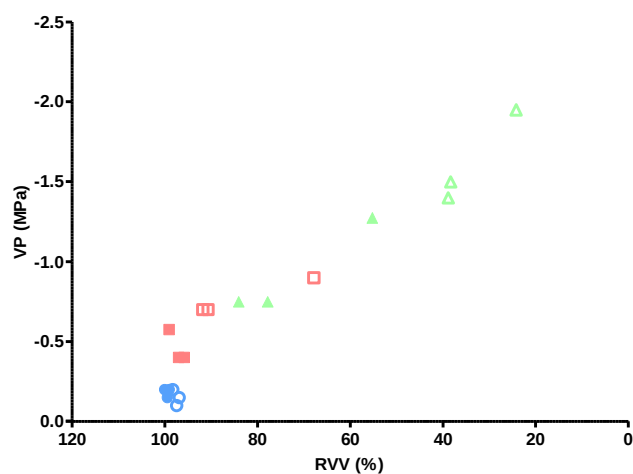
a)



b)



c)



Slika 12 se nadaljuje (legenda na naslednji strani).

Slika 12: Prikaz relativne vsebnosti vode v listih (RVV) (a) in vodnega potenciala (VP) (b) v odvisnosti od vsebnosti vode v substratu (VVS) ter korelacija med RVV in VP (c) vseh merjenih rastlin v suši sorte 'Tiber' in 'Starozagorski črn' dan pred sušo ter v treh časovnih stopnjah suše.

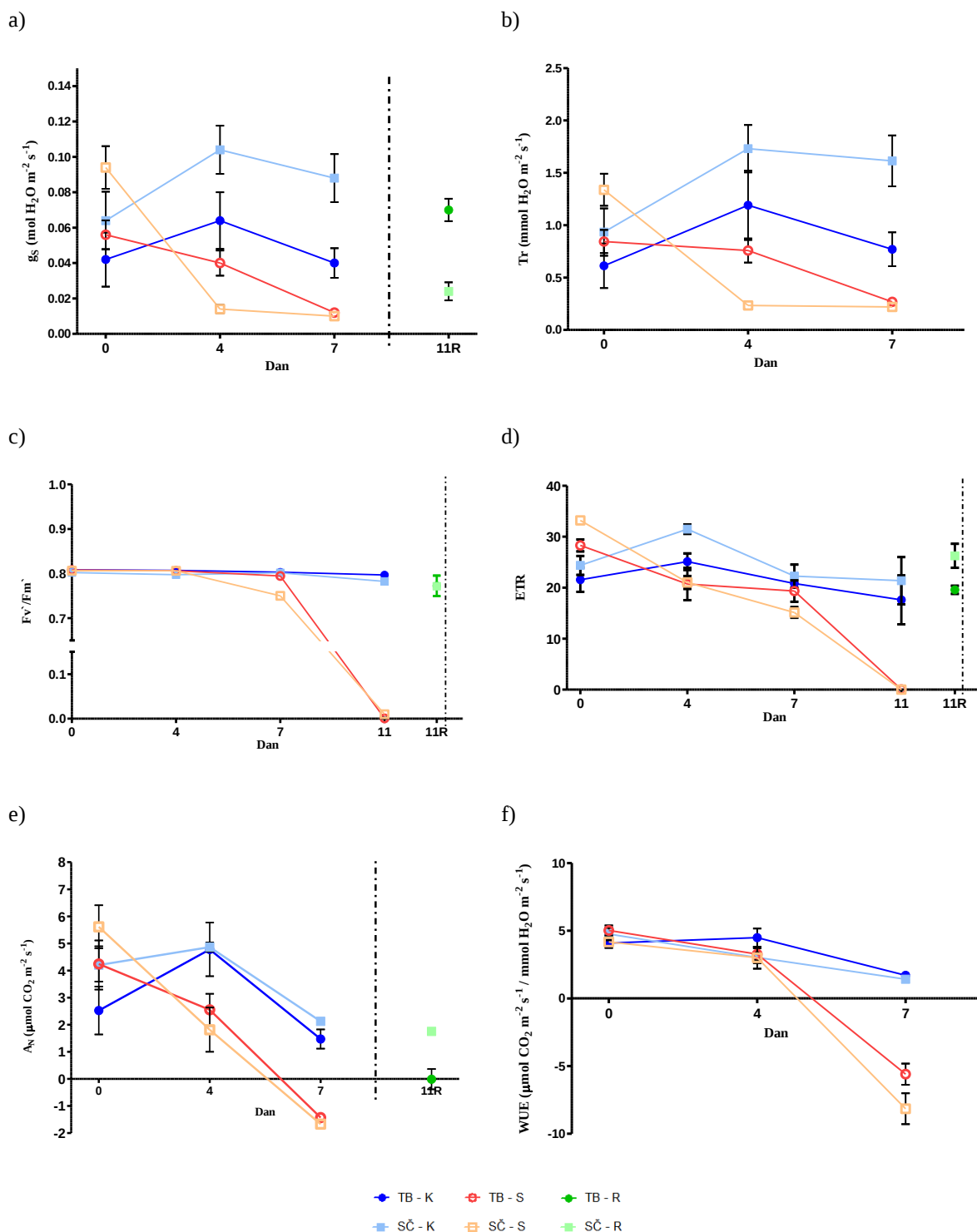
Figure 12: Relative water content in leaves (RVV) and water potential (VP) depending on soil water content (SVV), and the correlation between the RVV and VP (c) of all measured plants in drought of 'Tiber' and 'Starozagorski črn' cultivars before drought and at three time-stages of drought.

Povprečne vrednosti netofotosinteze (A_N), prevodnosti listnih rež (g_s), potencialne fotokemične učinkovitosti (F_v/F_m') in transpiracije (Tr) v odvisnosti od števila sušnih dni so prikazane na sliki 13. Stopnja suše je značilno vplivala na obravnavanja ($p = 0,0002$ pri g_s , $p < 0,0001$ pri ostalih). Ugotovili smo razlike med obravnavanji v vseh parametrih ($p = 0,0096$ pri A_N , $p < 0,001$ pri ostalih). Vpliv variance števila sušnih dni je bil statistično značilen pri vseh naštetih parametrih, razen pri Tr ($p = 0,132$). V 4. in 7. dnevu suše so bile značilne razlike v prevodnosti listnih rež med kontrolama sort 'Tiber' in 'Starozagorski' ($p < 0,05$) (Slika 13a). V četrtem dnevu suše je bilo zmanjšanje vode v listih dovolj, da so rastline sorte 'Starozagorski' že skoraj popolnoma zaprle listne reže, medtem ko je bila g_s pri sorti 'Tiber' povprečno $0,04 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Do močnega zmanjšanja prevodnosti je prišlo pri sorti 'Tiber' v sedmem dnevu suše. Statistično značilne razlike se med rastlinami starševskih linij niso pokazale, opazne pa so bile med rastlinami K in S sorte 'Starozagorski' v četrtem ter sedmem dnevu suše ($p < 0,001$). Enaki rezultati so se pokazali pri Tr (Slika 13b). Zaprtje listnih rež je močno omejilo Tr , kar kažejo velike razlike v Tr ($p < 0,001$) med rastlinami K in S sorte 'Starozagorski'. Število dni v suši ni vplivalo na razlike A_N (Slika 13e) lista med kontrolnimi rastlinami obeh starševskih linij, tudi razlik med rastlinami v suši ni bilo. Značilne razlike so bile med rastlinami K in S iste starševske linije, in sicer pri sorti 'Starozagorski' že v četrtem dnevu suše ($p < 0,01$), pri sorti 'Tiber' v sedmem dnevu ($p < 0,01$), kjer so se razlike A_N pri sorti 'Starozagorski' samo še stopnjevale ($p < 0,001$). V WUE so se razlike pokazale med rastlinami K in S iste sorte šele sedmi dan ($p < 0,001$) (Slika 13f). Tistega dne so bile razlike tudi med starševskima linijama, kjer je imela sorta 'Tiber' večjo WUE ($p < 0,01$) kot sorta 'Starozagorski'.

Pri F_v/F_m' značilnih razlik med kontrolnimi in sušnimi rastlinami do sedmega dneva suše, razen pri sorti 'Starozagorski' ($p < 0,005$), ni bilo. Prav tako ni bilo opaziti značilnih razlik med starševskima linijama. Statističnih razlik med vsemi vzorci v ETR ni bilo, čeprav so se vrednosti kontrol in rastlin v suši gibale od 19,34 do 33,18.

Enajsti dan so rastlinam predvsem starejši listi močno oveneli, se posušili ali celo odpadli. Meritve z aparatom LI-COR na takih listih niso bile mogoče, zato podatki parametrov, ki smo jih merili z njim, niso prikazani. Rezultati parametrov g_s in A_N rehidriranih rastlin kažejo, da so si te rastline po ponovnem zalivanju opomogle.

Z rezultati primerjave parametrov smo ugotovili močno stomatalno inhibicijo že pri 15 % izgubi vode v listih (Priloga H). Podoben odziv pokaže tudi zmanjšanje VP, kjer pri VP nižjem od $-0,7 \text{ MPa}$ g_s ni večja od $0,02 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Sočasno se z zapiranjem listnih rež manjša tudi količina dostopnega CO_2 ter s tem A_N .



Slika 13: Prikaz fizioloških parametrov rastlin, izpostavljenih suši, in kontrolnih rastlin sorte 'Tiber' ter 'Starozagorski črn' pred sušo, v dveh ali treh časovnih stopnjah suše in v rehidraciji. Prikazane so povprečne vrednosti petih ponovitev na obravnavanje in $\pm$ standardne napake; a) prevodnost listnih rež (g_s), b) transpiracija (Tr), c) potencialna fotokemična učinkovitost (Fv'/Fm'), d) hitrost transporta elektronov (ETR), e) netofotosinteza (A_N), f) učinkovitost izrabe vode (WUE), K – kontrola, S – suša, R – rehidracija.

Figure 13: Photosynthetic parameters of plants in drought and control plants of 'Tiber' and 'Starozagorski črn' cultivars before drought, at two time-stages of drought and at rehydration. Data

are means of three plants with their $\pm$ standard error. a) conductivity (g_s), b) transpiration (Tr), c) potential photochemical efficiency (F_v'/F_m'), d) electron transport rate (ETR), e) neto-photosynthesis (A_N), f) water use efficiency (WUE), K – control, S – drought, R – rehydration.

4.1.3 Vrednotenje polimorfizmov molekulskih markerjev

Starševski liniji smo z analizo PCR okarakterizirali s skupno 1034 molekulskimi markerji (Preglednica 14, Priloga I).

Preglednica 14: Število testiranih molekulskih markerjev in delež polimorfnih kombinacij.

Table 14: Number of molecular markers tested and percent of polymorphic combinations.

Markerski sistem	Število testiranih kombinacij	Število polimorfnih kombinacij	Delež polimorfnih kombinacij (%)	Število polimorfnih markerjev
Mikrosateliti	477	102	21,4	102
AFLP	256	27	10,5	27
ISSR	20	16	80,0	53
RAPD	6	1	16,6	1
delno-specifični	7	4	57,0	11
SRAP-RGA	136	51	37,5	60
RGAP	68	26	38,0	49
SRAP	64	26	40,0	40
Skupaj	1034	253	24,5	343

Skupni delež polimorfnih kombinacij je znašal 24,5 %. Največ polimorfizmov med starševskima linijama smo dobili z markerji ISSR, in sicer 80 %, saj je bilo med 20 testiranimi kombinacijami kar 16 polimorfnih. Več kot polovica testiranih kombinacij je bila polimorfna samo še pri delno-specifičnih markerjih (57 %). Od 37,5 do 40 % polimorfnosti smo dobili pri testiranju molekulskih markerjev SRAP-RGA, RGA in SRAP. Pri RAPD in mikrosatelitih smo dobili 16,6 in 21,4% polimorfnost. Najmanjši delež, 10,5 % polimorfnih kombinacij, smo dobili z markerji AFLP z 256 testiranimi kombinacijami. Skupno število polimorfnih markerjev med sortama 'Tiber' in 'Starozagorski' je 343.

4.1.4 Vpliv sušnega stresa na izražanje genov, ki kodirajo akvaporine

4.1.4.1 Identifikacija sekvenc DNA podobnih znanim genom za akvaporine

V času začetka naše raziskave sekveniranje genoma navadnega fižola še ni bilo končano; posledično sekvence njegovih akvaporinov (AKP) še niso bile poznane. Za pomnoževanje sekvenc DNA podobnih genom, ki kodirajo akvaporine pripadnike družine MIP s tehniko PCR smo uporabili 12 degeneriranih začetnih oligonukleotidov narejenih na podlagi ohranjenih aminokislinskih motivov poddružin AKP, PIP in TIP iz bombaža (Park in sod., 2010). Z uporabo 18 različnih kombinacij degeneriranih oligonukleotidov smo uspešno namnožili 16 produktov fragmentov DNA dolžine 500–1000 bp. Sedem različnih vzorcev kombinacij degeneriranih oligonukleotidov z koncentracijo DNA večjo od 10 ng/ μ l smo klonirali in pridobili od tri do trinajst sekveniranih klonov za vsak produkt PCR

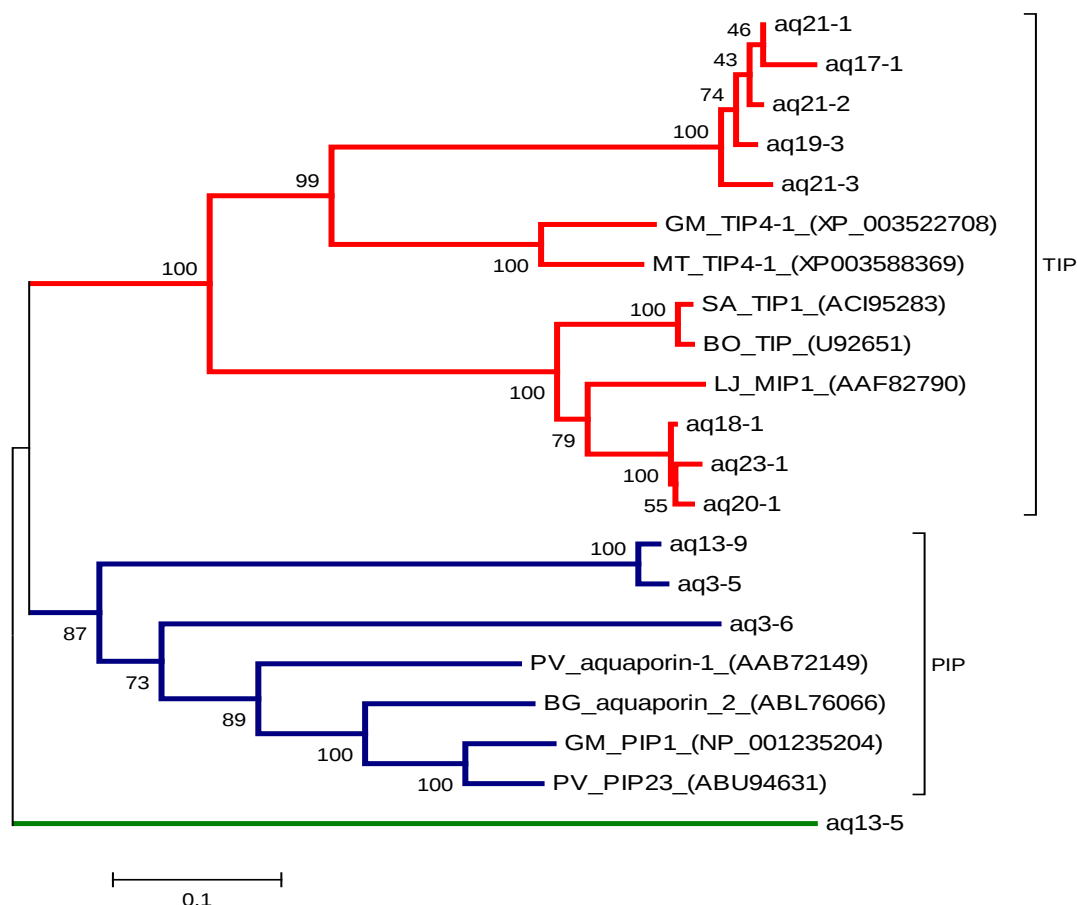
(Preglednica 15). Prva številka v imenu akvaporinskim genom podobni sekvenci je številka izoliranega fragmenta DNA, druga je številka klona (npr. aq21-1: akvaporin navadnega fižola izoliran kot 21. fragment DNA, klon 1).

Preglednica 15: Seznam sekvenc podobnih akvaporinskim genom s pozicijo začetnih oligonukleotidov in oceno dolžine produkta fragmenta DNA. F – smerni oligonukleotid, R – protismerni oligonukleotid, TMD – transmembranska domena, L – zanka.

Table 15: List and position of degenerate primer combinations of aquaporin-like gene sequences and the approximations of DNA fragment length. F – forward primer, R – reverse primer, TMD – transmembran domain, L – loop.

Oznaka kombinacije	Ime sekvence	Pozicija smerne oligonukleotida	Pozicija protismernega oligonukleotida	Dolžina produkta PCR (bp) (ocena)
2	aq3-5, aq3-6	<i>PIP-F2</i> (N terminalni konec)	<i>PIP-R2</i> (L 5/3. mesto vezave)	1000
7	aq13-5, aq13-9	<i>PIP-F2</i> (N terminalni konec)	<i>PIP-R1</i> (TMD6)	900-1000
11	aq17-1	<i>TIP-F2</i> (TMD2)	<i>TIP-R2</i> (TMD6)	900
12	aq18-1	<i>TIP-F3</i> (TMD2)	<i>TIP-R3</i> (TMD6)	600
13	aq19-3	<i>TIP-F1</i> (TMD1/1. mesto vezave)	<i>TIP-R2</i> (TMD6)	500
14	aq20-1, aq21-1, aq21-2, aq21-3	<i>TIP-F2</i> (TMD2)	<i>TIP-R3</i> (TMD6)	500-650
16	aq23-1	<i>TIP-F3</i> (TMD2)	<i>TIP-R1</i> (L5)	650

Za uvrstitev sekvenc podobnih AKP v poddružine MIP smo skonstruirali filogenetsko drevo in primerjali sekvence podobne AKP, pridobljene iz navadnega fižola s pomočjo degeneriranih oligonukleotidov bombaža, z znanimi sekvencami genov AKP soje (*Glycine max* (L.) Merr.), trnate meteljke (*Medicago truncatula* Gaertn.), njivske gorčice (*Sinapis arvensis* L.), cvetače (*Brassica oleracea* var. *Botrytis*) L., nokote (*Lotus japonicus* L.), navadnega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.) in črnega mangova (*Bruguiera gymnorrhiza* (L.) Lam.) (Slika 14).



Slika 14: Filogenetsko drevo fižolovih aminokislinskih sekvenc podobnih akvaporinom in aminokislinskih sekvenc že znanih akvaporinov drugih rastlinskih vrst. GM: *Glycine max*; MT: *Medicago truncatula*, SA: *Sinapis arvensis*, BO: *Brassica oleracea*; LJ: *Lotus japonicus*; PV: *Phaseolus vulgaris*; BG: *Bruguiera gymnorhiza*.

Figure 14: Phylogenetic tree of aquaporin-like amino acid sequences and known amino acid sequences of aquaporin genes of other plant species. GM: *Glycine max*; MT: *Medicago truncatula*, SA: *Sinapis arvensis*, BO: *Brassica oleracea*; LJ: *Lotus japonicus*; PV: *Phaseolus vulgaris*; BG: *Bruguiera gymnorhiza*.

Uspešno smo razporedili pridobljene sekvence podobne AKP navadnega fižola kot predstavnike poddružine PIP in TIP. Tri (aq13-9, aq3-5, aq3-6,) sodijo med PIP, osem (aq21-1, aq17-1, aq21-2, aq19-3, aq21-3, aq18-1, aq23-1, aq20-1) jih sodi med TIP, le sekvenca aq13-5 ne sodi v nobeno od teh dveh poddružin. Na podlagi podobnosti sekvenc smo poddružino PIP razdelili v tri manjše skupine: PIP1, PIP2 in PIP3. Sekvenci aq13-9 in aq3-5 si delita 87 % aminokislinske sestave z aq3-6 in referenčnimi sekvencami PV-aqp1, BG_aqp2, BM_PIP1 in PV_PIP2;3, ki pa imajo 27 % različnih aminokislin od aq3-6. Največja podobnost aminokislinske sestave je med AKP sekvencami soje, navadnega fižola in vrste črnega mangrova. V poddružini TIP smo sekvence podobne AKP razdelili na podskupini, ki si delita manj kot 80 % aminokislinske sestave. Prva skupina je sestavljena iz petih sekvenc z največjo podobnostjo s sekvencami TIP soje, trnate meteljke, njivske gorčice in cvetače. V drugo skupino se uvrščajo 3 sekvence (aq18-1, aq23-1 in aq20-1), ki so najbolj podobne membranskim intrinzičnim proteinom nokote iz sosednje skupine. Ena od sekvenc podobnih AKP, aq13-5, z dolžino 328 aminokislin, z manj kot 20% podobnostjo zaporedja sekvence, ne sodi v nobeno od poddružini TIP in PIP.

Znane ohranjene motive (NPA-motiv) in aminokislinske ostanke (ar/R-selektivno sito) akvaporinskih proteinov, ki označujejo AKP kot kanalske proteine prepustne za vodo in druge topljence, smo v sekvencah podobnih AKP poiskali s pomočjo sekvenčne poravnave le-teh s sekvencami že znanih AKP rastlin *G. max*, *M. truncatula*, *S. arvensis*, *B. oleracea* var. *Botrytis*, *L. japonica*, *P. vulgaris* in *B. gymnorrhiza* (Slika 15).

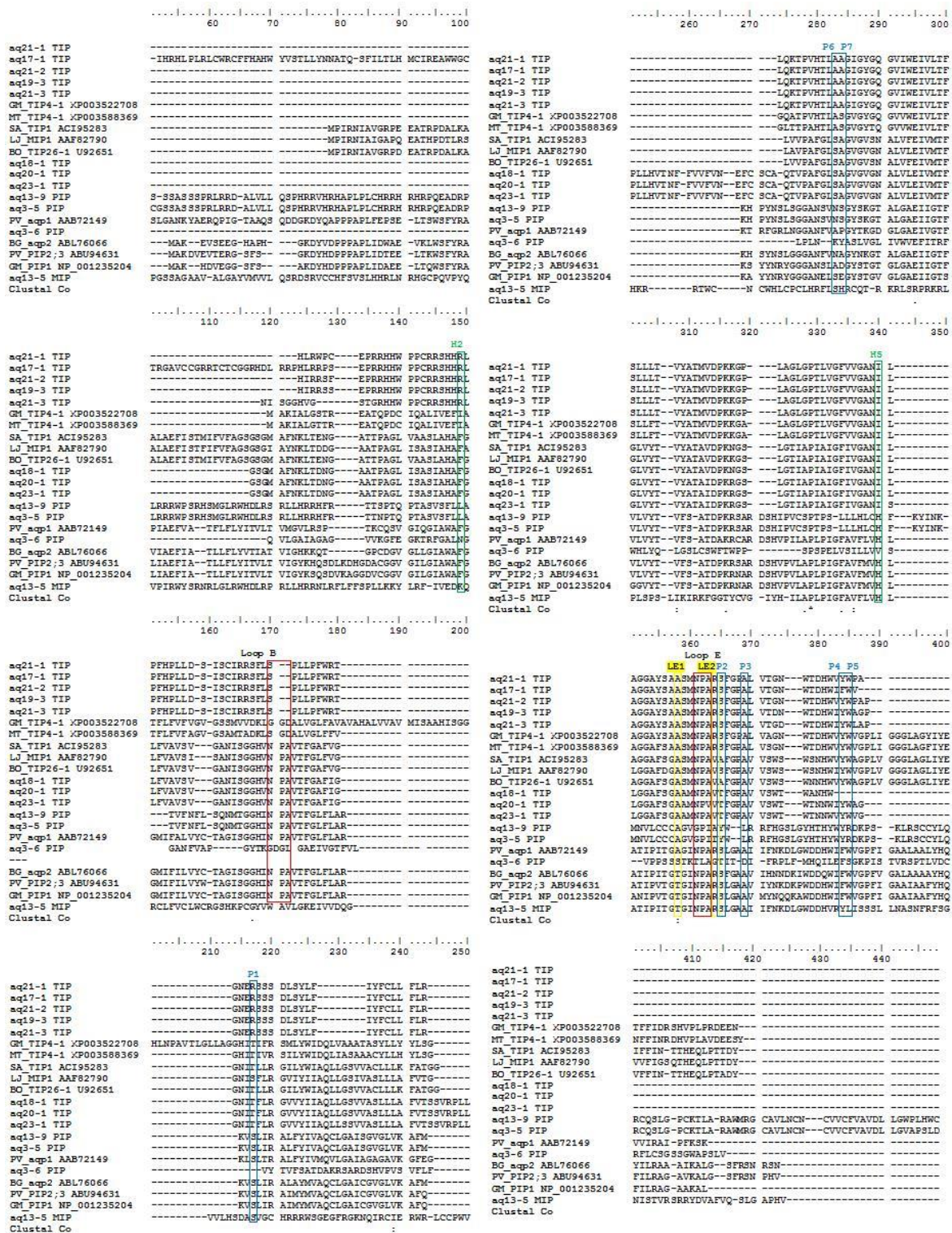
Z analizo večkratnega prileganja sekvenc smo v večini sekvenc podobnih AKP določili znane ohranjene motive, kar je potrdilo njihovo funkcijo (Preglednica 16).

Preglednica 16: Prisotnost motiva NPA in ar/R-selektivnega sita v fižolovih aminokislinskih sekvencah podobnih akvaporinom. V celotni aminokislinski sekvenci akvaporinov se NPA (asparagin-prolin-alanin) motiv nahaja na dveh mestih – I in II, ar/R selektivno sito pa na dveh transmembranskih zankah H2 in H5 in na dveh mestih zanke E – LE1 in LE2. A – alanin, R – arginin, N – asparagin, F – fenilalanin, G – glicin, H – histidin, I – izolevcin, L – levcin, S – serin, T – treonin, W – triptofan, V – valin.

Table 16: Presence of the NPA-motifs and ar/R-selective filters in aquaporin-like amino acid sequences of common bean. In the entire aquaporin amino acid sequence NPA (asparagine-proline-alanine) is located in two places – I and II, whereas ar/R selective filter is located on two transmembrane loops H2 and H5 and on two places of loop E – LE1 and LE2. A – alanine, R – arginine, N – asparagine, F – phenylalanine, G – glycine, H – histidine, I – isoleucine, L – leucine, S – serine, T – threonine, W – tryptophan, V – valine.

Podružina	Ime	NPA-motiv		Ar/R-selektivno sito			
		I	II	H2	H5	LE1	LE2
TIP	aq21-1	S - -	NPA	R	I	A	R
	aq17-1	S - -	NPA	R	I	A	R
	aq21-2	S - -	NPA	R	I	A	R
	aq19-3	S - -	NPA	R	I	A	R
	aq21-3	S - -	NPA	R	I	A	R
	aq18-1	NPA	NPA	F	I	A	V
	aq23-1	NPA	NPA	F	I	A	V
	aq20-1	NPA	NPV	F	I	A	V
	aq13-9	NPA	GPI	L	H	A	A
PIP	aq3-5	NPA	GPI	L	H	A	T
	aq3-6	LGA	TLA	N	V	S	G
	aq13-5	WAV	NPA	K	H	T	R

Z algoritmom tblastx programskega paketa BLAST smo za kombinacije oligonukleotidov poiskali podobnosti zaporedij z akcesijami v bazi podatkov GenBank (NCBI) (Altschul in sod., 1997). Najbolj podobne sekvence, ki smo jih pridobili za posamezno kombinacijo oligonukleotidov, so opisane v prilogi J.



Slika 15 se nadaljuje (legenda na naslednji strani).

Slika 15: Poravnava aminokislinskih sekvenc podobnih akvaporinom z že znanimi sekvencami akvaporinov drugih rastlinskih vrst. GM: *Glycine max* PIP1 (NP_001235204), TIP4-1 (XP_003522708); MT: *Medicago truncatula* TIP4-1 (XP003588369), SA: *Sinapis arvensis* TIP1 (ACI95283), BO: *Brassica oleracea* TIP26-1 (U92651); LJ: *Lotus japonicus* MIP1 (AAF82790); PV: *Phaseolus vulgaris* PIP2;3 (ABU94631), aq1 (AAB72149); BG: *Bruguiera gymnorhiza* aquaporin 2 (ABL76066). Ohranjene aminokislinske sekvence so prikazane v kvadratih na pozicijah od P1 do P7, v dveh transmembranskih zankah, H2 in H5, ter v zankah B in E.

Figure 15: Annealing of aquaporin-like amino acid sequences and known aquaporin genes of other plant species. GM: *Glycine max* PIP1 (NP_001235204), TIP4-1 (XP_003522708); MT: *Medicago truncatula* TIP4-1 (XP003588369), SA: *Sinapis arvensis* TIP1 (ACI95283), BO: *Brassica oleracea* TIP26-1 (U92651); LJ: *Lotus japonicus* MIP1 (AAF82790); PV: *Phaseolus vulgaris* PIP2;3 (ABU94631), aq1 (AAB72149); BG: *Bruguiera gymnorhiza* aquaporin 2 (ABL76066). Squares present the conserved motifs on positions P1 to P7 in two transmembran loops H2 and H5 and in B and E loops.

4.1.4.2 Vpliv suše na izražanje genov *PvPIP1;2*, *PvPIP2;7*, *PvTIP1;1*, *PvTIP4;1*

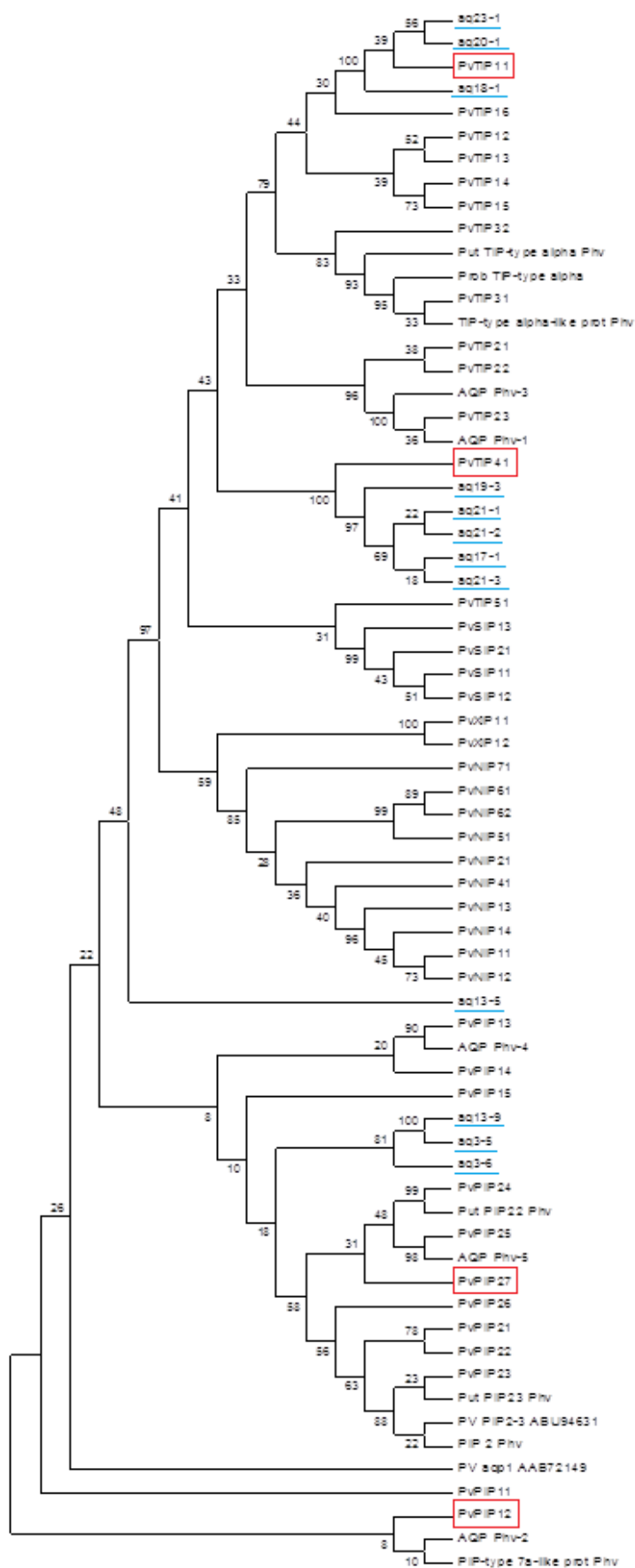
Schmutz in sod. so v letu 2014 objavili referenčni genom navadnega fižola andskega genotipa, ki je omogočil hitrejši napredek raziskav identifikacije genov navadnega fižola in njihovih funkcij. Objava fižolovega genoma je omogočila natančnejšo karakterizacijo genov, ki kodirajo AKP dveh poddružin, PIP in TIP.

S pomočjo filogenetskega drevesa smo izbrali gene, v katerih smo s poravnavo našli sekvence najbolj podobne tistim, ki smo jih identificirali kot sekvence podobne AKP (Slika 17). Izbrane gene, *PvPIP1;2*, *PvPIP2;7*, *PvTIP1;1* in *PvTIP4;1*, so predhodno identificirali v navadnem fižolu, na filogenetskem in strukturnem nivoju, s pomočjo genov AKP navadnega repnjakovca (Ariani in Gepts, 2015). Izražanje teh genov v listih kontrolnih rastlin obeh starševskih linij smo uspešno potrdili z metodo PCR v realnem času. Na agarozni elektroforezi smo dobili kvalitetne enojne produkte za vse štiri izbrane gene AKP in dva referenčna gena, *IDE* ter *Ukn2* (Slika 16).



Slika 16: Vizualizacija produktov PCR štirih akvaporinskih genov (*PvPIP1;2*, *PvPIP2;7*, *PvTIP1;1*, *PvTIP4;1*) in dveh referenčnih genov (*IDE*, *Ukn2*) pri kontrolnih rastlinah sorte 'Tiber' (T) in 'Starozagorski črn' (S) na 1,4% agaroznem gelu.

Figure 16: Visualization of PCR amplifications of four aquaporin genes (*PvPIP1;2*, *PvPIP2;7*, *PvTIP1;1*, *PvTIP4;1*) and two reference genes (*IDE*, *Ukn2*) in control plants of 'Tiber' (T) and 'Starozagorski črn' (S) cultivars on the 1,4% agarose gel.



Slika 17: Filogenetsko drevo fižolovih sekvenc DNA, ki kodirajo akvaporine in sekvenc, ki so njim podobne. Z rdečim kvadratom so označene izbrane akvaporinske sekvence, z modro pa so podčrtane akvaporinom podobne sekvence, ki smo jih identificirali v naši raziskavi.

Figure 17: Phylogenetic tree of common bean aquaporin and aquaporin-like DNA sequences. Red square presents the chosen aquaporin genes, blue line presents aquaporin-like genes identified in our study.

Na osnovi rezultatov karakterizacije genov, ki kodirajo AKP, smo se odločili, da bomo preučili vpliv suše na izražanje genov *PvPIP1;2*, *PvPIP2;7*, *PvTIP1;1* in *PvTIP4;1* v polno razvitih tretjih sestavljenih listih sorte 'Tiber' in sorte 'Starozagorski' – na podlagi poskusa IJS 1. Liste smo vzorčili dan pred sušo, 5., 9. in 11. dan suše ter 24 ur po rehidraciji. Pri analizi smo uporabili referenčna gena, *IDE* in *Ukn2*. Primerjali smo stopnje izražanja vsakega od izbranih genov poddružin PIP in TIP (Slika 18) v kontrolnih rastlinah in rastlinah, izpostavljenih sušnem stresu obeh starševskih linij. Tako smo določili vpliv sorte, stopnje suše in njihove interakcije (Preglednica 17). Vodni status rastlin smo določili z meritvami vsebnosti vode v substratu in listu ter z meritvami vodnega potenciala (VP). Relativna vsebnost vode v listu (RVV) in VP v poskusu IJS 1 so predstavljeni v prilogi F.

Preglednica 17: Rezultati dvosmerne ANOVA (sorta × stopnja suše) relativne stopnje izražanja genov akvaporinov v vzorcih sorte 'Tiber' in 'Starozagorski črn' v 5., 9. in 11. dnevu suše ter rehidraciji iz poskusa IJS 1. Prikazan je vir variacije, F-vrednost in p-vrednost pri stopnji prostosti = 1. Odebeljene vrednosti prikazujejo statistično značilno razliko v izražanju genov.

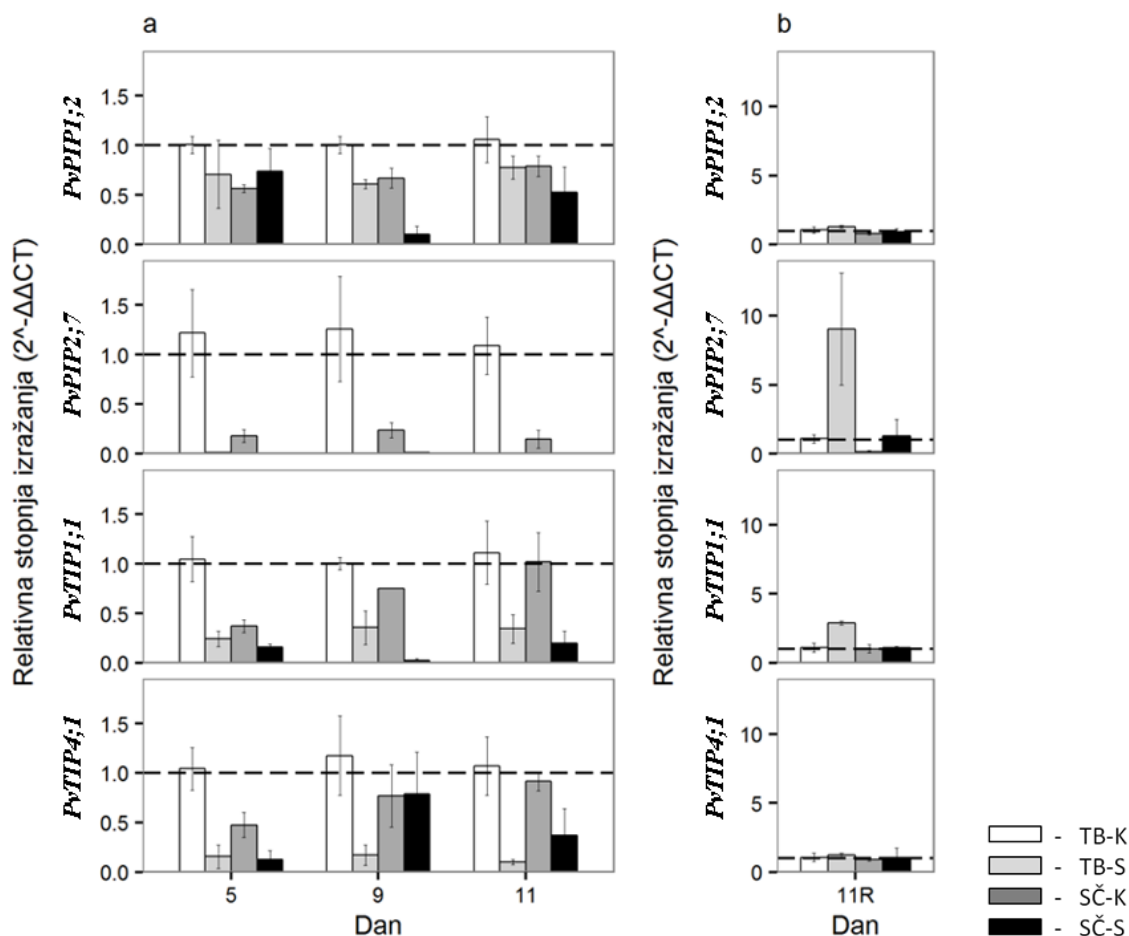
Table 17: Results of two-way ANOVA (cultivar × stage of drought) for relative expression of four aquaporin genes of 'Tiber' and 'Starozagorski črn' cultivars on day 5, 9 and 11 of drought stage and at rehydration (11R) from IJS 1 experiment. Source of variation, F-value and p-value at one degree of freedom are displayed. Values in bold represents statistical significant differences.

Vir variacije	Dan 5		Dan 9		Dan 11		Dan 11R	
	F-vrednost	p-vrednost	F-vrednost	p-vrednost	F-vrednost	p-vrednost	F-vrednost	p-vrednost
<i>PvPIP1;2</i>								
Sorta	0.9	0.359	21.8	0.002	1.9	0.204	3.5	0.102
Stopnja suše	0.1	0.778	30.6	< 0.001	2.1	0.186	1.3	0.292
Sorta:Stopnja suše	1.2	0.300	0.9	0.366	0.0	0.966	0.1	0.754
<i>PvPIP2;7</i>								
Sorta	5.6	0.046	3.5	0.104	9.7	0.014	2.9	0.134
Stopnja suše	9.8	0.014	5.2	0.057	16.3	0.004	4.5	0.072
Sorta:Stopnja suše	5.4	0.049	2.9	0.133	9.7	0.014	2.1	0.192
<i>PvTIP1;1</i>								
Sorta	9.3	0.016	18.7	0.003	0.3	0.625	11.0	0.013
Stopnja suše	16.6	0.004	108.9	< 0.001	11.4	0.010	16.9	0.004
Sorta:Stopnja suše	5.7	0.044	0.3	0.573	0.0	0.910	10.9	0.013
<i>PvTIP4;1</i>								
Sorta	4.3	0.072	0.0	0.900	0.1	0.782	0.3	0.594
Stopnja suše	18.3	0.003	1.3	0.285	13.7	0.006	0.2	0.650
Sorta:Stopnja suše	3.5	0.097	1.8	0.217	1.1	0.326	0.0	0.962

Pomanjkanje vode je povzročilo zmanjšanje stopnje izražanja pri rastlinah, izpostavljenih suši, v primerjavi s kontrolnimi rastlinami. Ugotovili smo, da so razlike v izražanju v starševskih linijah pri vseh preučevanih genih AKP, razen pri genu *PvTIP4;1*. V 5. in 9. dnevu suše je relativna stopnja izražanja gena *PvTIP4;1* pri sorti 'Tiber' (VP = $-0,71 \pm 0,1$ MPa in $-1,15 \pm 0,08$ MPa) 9–15 % stopnje kontrolnih rastlin sorte 'Tiber'. Pri sorti

'Starozagorski' ($VP = -1,18 \pm 0,32$ MPa in $-2,67 \pm 0,52$ MPa) je relativna stopnja izražanja istega gena 27–41 % stopnje kontrolnih rastlin sorte 'Starozagorski'.

Pri obeh genih, ki kodirata AKP poddružine PIP, in pri genu *PvTIP1;1* smo pri kontrolnih rastlinah in rastlinah, izpostavljenih suši, ugotovili specifično izražanje genotipa (Preglednica 17). Relativna stopnja izražanja vseh štirih genov AKP, v različnih dneh suše, je statistično značilno nižja pri sorti 'Starozagorski' v primerjavi s sorto 'Tiber' (Slika 18a).



Slika 18: Relativna stopnja izražanja ($2^{-\Delta\Delta CT}$) genov *PvPIP1;2*, *PvPIP2;7*, *PvTIP1;1* in *PvTIP4;1* pri sorti 'Tiber' in sorti 'Starozagorski črn' iz poskusa IJS 1 (Priloga IJS 1) (Zupin in sod., 2017: 6). Primerjava rezultatov analiz vzorcev kontrolnih rastlin in rastlin v suši (5., 9. in 11. dan suše) (a) ter v rehidraciji (11R) (b). Prikazane so povprečne vrednosti s $\pm$ standardno napako.

Figure 18: Relative expression level ($2^{-\Delta\Delta CT}$) of aquaporin genes *PvPIP1;2*, *PvPIP2;7*, *PvTIP1;1* and *PvTIP4;1* in common bean cultivars 'Tiber' and 'Starozagorski črn' of IJS 1 experiment (Appendix IJS 1) (Zupin et al., 2017: 6). Control and treated plants are compared on days 5, 9 and 11 of drought treatment (a) and at rehydration (11R) (b). Values are means $\pm$ standard error.

Razlike v izražanju dveh genov *PvPIP2;7* in *PvTIP4;1* v kontrolnih rastlinah in rastlinah izpostavljenih suši, so v starševskih linijah različne. Razlike v izražanju gena *PvPIP2;7* v kontrolnih rastlinah in v rastlinah, izpostavljenih suši, smo ugotovili 5. in 11. dan suše (Preglednica 17). Relativna stopnja izražanja gena *PvPIP2;7* pri kontrolnih rastlinah sorte

'Starozagorski' je znašala v vseh časovnih stopnjah suše 14–19 % relativne stopnje izražanja tega gena kontrolnih rastlin sorte 'Tiber' (Slika 18a). Pri rastlinah sorte 'Tiber', izpostavljenih suši, je relativna stopnja izražanja gena *PvPIP2;7* zmanjšana na 0,2–0,9 % relativne stopnje kontrolnih rastlin sorte 'Tiber', pri rastlinah sorte 'Starozagorski' pa na 0,8–6,8 % relativne stopnje kontrolnih rastlin sorte 'Starozagorski' v dnevih suše. Pri genu *PvTIP1;1* smo razlike v izražanju pri starševskih linijah ugotovili 5. in 9. dan suše, kjer je VP sorte 'Tiber' $-0,71 \pm 0,1$ MPa in $-1,15 \pm 0,08$ MPa in sorte 'Starozagorski' $-1,18 \pm 0,32$ MPa ter $-2,67 \pm 0,52$ MPa. Deveti in 11. dan suše (VP sorte 'Tiber' je $-2,75 \pm 0,2$ in sorte 'Starozagorski' je $-2,47 \pm 0,49$ MPa) smo ugotovili tudi razlike v izražanju tega gena pri rastlinah v kontroli ter rastlinah, izpostavljenih suši, vendar značilnih interakcij med sorto in stopnjo suše ni bilo (Slika 18a). Pri *PvPIP1;2* smo razlike v izražanju pri starševskih linijah in pri rastlinah v kontroli ter rastlinah, izpostavljenih suši, ugotovili 9. dan suše, vendar značilnih interakcij med sorto in stopnjo suše tudi tu ni bilo.

Pri rehidriranih rastlinah je relativna stopnja izražanja izenačena s kontrolnimi rastlinami ali pa je celo višja (VP sorte 'Tiber' je $-0,48 \pm 0,09$ in sorte 'Starozagorski' $-0,8 \pm 0,25$ MPa) (Slika 18b). Izkazalo se je, da je izražanje genov *PvPIP1;2* in *PvTIP4;1* pri rehidriranih rastlinah enako relativni stopnji izražanja teh genov pri kontrolnih rastlinah. Ugotovili smo, da so razlike v izražanju gena *PvTIP1;1* pri kontrolnih in rehidriranih rastlinah različne pri starševskih linijah (Preglednica 17). Pri sorti 'Tiber' je relativna stopnja izražanja tega gena v rehidraciji skoraj trikratna, medtem ko je pri sorti 'Starozagorski' podobna izražanju gena pri kontrolnih rastlinah. Relativna stopnja izražanja *PvPIP2;7* gena je pri sorti 'Tiber' do šestkrat višja kot pri kontrolnih in rehidriranih rastlinah sorte 'Starozagorski'. S primerjavo relativne stopnje izražanja gena *PvPIP2;7* rehidriranih rastlin s kontrolnimi rastlinami obeh starševskih linij smo ugotovili povečanje relativne stopnje izražanja gena *PvPIP2;7* za več kot osemkrat.

4.1.5 Vpliv sušnega stresa na izražanje genov proteaz *PvSLP1* in *PvSLP2*

Analizo izražanja genov *PvSLP1* in *PvSLP2*, ki kodirata subtilizinu podobni serinski proteazi, smo izvedli na tretjem sestavljenem popolnoma razvitem listu rastlin navadnega fižola sorte 'Tiber' in 'Starozagorski': v kontrolnih rastlinah, vzorčenih 4. dan suše, in v rastlinah izpostavljenih suši, ki so bile vzorčene 10., 24. in 38. dan suše v dveh ponovitvah v poskusu BF_{SL}. Vodni status rastlin smo določili z meritvami VP in RVV v listu. Ti rezultati so prikazani v prilogi G.

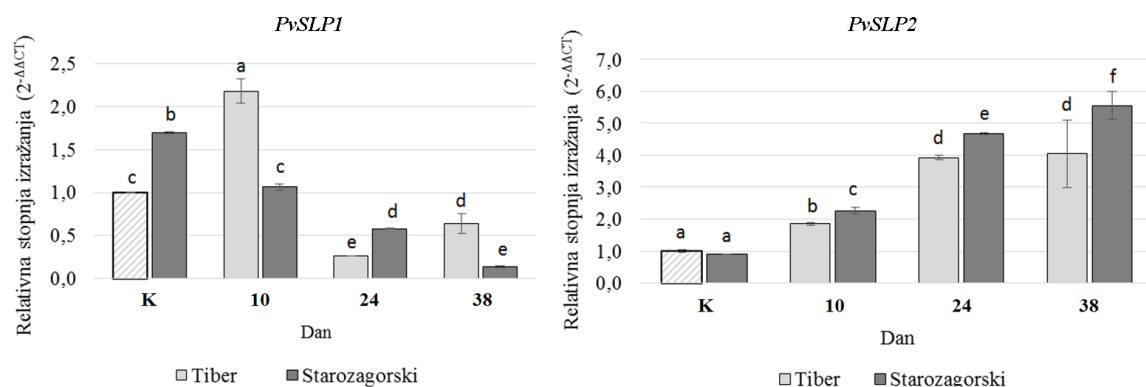
Na sliki 19 so prikazane relativne vrednosti stopnje izražanja ($2^{-\Delta\Delta CT}$) genov *PvSLP1* in *PvSLP2* pri rastlinah, izpostavljenih suši, obeh starševskih linij, za vsak dan vzorčenja, relativno na stopnjo izražanja teh dveh genov pri kontrolnih rastlinah sorte 'Tiber' (črtkani stolpec). Stopnjo izražanja genov *PvSLP1* in *PvSLP2* smo primerjali med vsemi analiziranimi vzorci in statistično značilne razlike med njimi označili z različnimi malimi črkami (a, b, c, d, e, f).

Z analizo izražanja genov *PvSLP1* in *PvSLP2* smo ugotovili, da se relativna stopnja izražanja obeh genov pri rastlinah obeh starševskih linij, vzorčenih v 10., 24. in 38. dnevu suše, razlikuje (je večja ali manjša) v primerjavi s stopnjo izražanja teh genov pri

kontrolnih rastlinah sorte 'Tiber'. Izjema je le izražanje gena *PvSLP1* pri sorti 'Starozagorski' v 10. dnevu suše (VP = -0,15 MPa). Pri enakem genu je bila razlika v izražanju tudi med kontrolnimi rastlinami starševskih linij, kjer je znašala pri sorti 'Starozagorski' (VP = -0,12 MPa) 165 % stopnje izražanja tega gena v rastlinah sorte 'Tiber' (VP = -0,25 MPa). Deseti dan suše se je relativna stopnja izražanja gena *PvSLP1* pri sorti 'Starozagorski' zmanjšala za prav toliko odstotkov.

Pri obeh analiziranih genih smo ugotovili razlike v stopnji izražanja med starševskima linijama. Razlike smo opazili pri vseh vzorcih rastlin, izpostavljenih suši, obeh starševskih linij. Relativna stopnja izražanja gena *PvSLP1* se je v 10. dnevu suše pri rastlinah sorte 'Tiber' (VP = -0,15 MPa) za več kot 2-krat povečala v primerjavi s kontrolnimi rastlinami sorte 'Tiber', pri stresiranih rastlinah sorte 'Starozagorski' (VP = -0,15 MPa) pa je bila enaka stopnji izražanja tega gena pri kontrolnih rastlinah sorte 'Tiber'. 24. in 38. dan suše se je izražanje gena *PvSLP1* pri obeh starševskih linijah zmanjšalo (VP sorte 'Tiber' -0,25 in -1,05 MPa ter sorte 'Starozagorski' -0,33 in -2,50 MPa). Ugotovili smo, da je pri teh dveh stopnjah suše, relativna stopnja izražanja gena *PvSLP1* pri rastlinah sorte 'Tiber' 26–64 % stopnje izražanja tega gena, pri kontrolnih rastlinah sorte 'Tiber', pri rastlinah sorte 'Starozagorski' pa 58–14 % relativne stopnje izražanja gena *PvSLP1* pri kontrolnih rastlinah sorte 'Tiber'.

Relativna stopnja izražanja gena *PvSLP2* se med kontrolnimi vzorci starševskih linij ni razlikovala. Pri vseh vzorcih rastlin v suši se je relativna stopnja izražanja tega gena pri obeh starševskih linijah linearno povečevala, le 24. dan suše se pri rastlinah sorte 'Tiber' ni spremenila. Ugotovili smo, da je pri sorti 'Tiber' 10. dan suše relativna stopnja izražanja gena *PvSLP2* skoraj 2-krat večja, 24. in 38. dan pa štirikrat večja od relativne stopnje izražanja tega gena pri kontrolnih rastlinah sorte 'Tiber'. Pri sorti 'Starozagorski' je 10. dan suše relativna stopnja izražanja gena *PvSLP2* 226 %, 24. dan 468 % in 38. dan 555 % stopnje izražanja tega gena pri kontrolnih rastlinah sorte 'Tiber'.



Slika 19: Relativna stopnja izražanja ($2^{-\Delta\Delta CT}$) genov *PvSLP1* in *PvSLP2* pri kontrolnih rastlinah (K) in v vzorcih rastlin, izpostavljenih suši (10., 24., 38. dan), glede na stopnjo izražanja pri kontrolnih rastlinah sorte 'Tiber' (črtkani stolpec).

Figure 19: Relative expression rate ($2^{-\Delta\Delta CT}$) of *PvSLP1* and *PvSLP2* genes in control (K) and drought stressed plants (day 10, 24 and 38) according to expression rates of control plants of 'Tiber' cultivar (dotted column).

4.2 KARAKTERIZACIJA RASTLIN REKOMBINANTNIH INBRIDIRANIH LINIJ

4.2.1 Vrednotenje morfoloških, fenoloških lastnosti in pridelka

Morfološke in fenološke lastnosti, pri katerih sta se starševski liniji razlikovali, ter količino pridelka, smo ovrednotili tudi na potomcih. Preglednica 18 prikazuje frekvenčno porazdelitev kategoričnih morfoloških znakov, preglednica 19 pa osnovno statistiko numeričnih fenoloških znakov in treh lastnosti vrednotenja pridelka, pridobljenih na vzorcih 80 rekombinantnih inbridiranih linij navadnega fižola. Rastline RIL30 in RIL87 smo iz teh analiz izločili zaradi nepopolnih podatkov pri obeh poskusih, saj so te rastline zelo slabo rastle in niso cvetele.

Preglednica 18: Frekvenčna porazdelitev kategoriziranih morfoloških znakov 80 RIL navadnega fižola. ¹ I – omejena pokončna grmičasta oblika rasti, II – neomejena pokončna grmičasta oblika rasti, III – neomejena neplezalna in polplezalna oblika rasti, IV – neomejena plezalna oblika rasti (Singh, 1991).

Table 18: Frequency of categorized morphological traits of 80 RILs of common bean. ¹ I – determinate upright bush growth habit, II – indeterminate upright bush growth habit, III – indeterminate prostrate non-climbing and semi-climbing bush growth habit, IV – indeterminate weak-stemmed climbing growth habit (Singh, 1991).

Rastlinski organ	Morfološki znak	Fenotip	Delež (%)
Cvet	Barva jadra	Bela	47,5
		Roza	33,8
		Vijolična	18,8
	Žilnatost jadra	Žilnato	20,0
		Gladko	80,0
	Velikost brakteole	Majhna	18,8
		Srednje velika	51,3
Velika		20,0	
Steblo	Barva	Zelena	80,0
		Zelena z vijoličnimi progami	20,0
	Tip (oblika) rasti ¹	I	10,0
		II	25,0
		III	65,0
Strok	Barva	Zelena	92,5
		Zelena z vijoličnimi progami	8,8
Seme	Osnovna barva	Bela	52,5
		Pisana	25,0
		Rjava	5,0
		Črna	17,5

Največ rastlin RIL ima belo barvo cvetov, tretjina ima cvetove roza barve, manj kot 20 % ima vijolične cvetove. Žilnatost jadra je pri 80 % rastlin RIL gladka. Polovica ima srednje veliko brakteolo, 18,8 % majhno in 20 % veliko. Pri rastlinah RIL močno prevladuje zelena barva stebela in stroka (80–92,5 %). Barve semen rastlin RIL smo razdelili v štiri skupine. Več kot polovica potomcev ima belo seme, četrtnina semen je pisanih, črnih semen je 17,5 %, 5 % je rjavih semen.

Preglednica 19: Osnovna statistika numeričnih fenoloških znakov in količine pridelka, pridobljenega na vzorcih 80 RIL navadnega fižola.

Table 19 Basic statistic of numerical phenological traits and yield parameters of 80 RILs of common bean.

Lastnost	Statistika	Vrednost	
		BF	KIS
Št. dni do cvetenja	Povprečje	39,53	26,10
	Minimum	38,00	23,00
	Maksimum	47,00	30,00
	Standardni odklon	2,25	1,47
	Koeficient variacije (%)	1,61	1,12
Št. dni do pojava strokov	Povprečje	53,75	31,34
	Minimum	52,00	26,00
	Maksimum	59,00	37,00
	Standardni odklon	1,40	2,50
	Koeficient variacije (%)	1,00	2,00
Št. strokov na rastlino	Povprečje	0,75	4,15
	Minimum	0,08	0,33
	Maksimum	2,00	8,75
	Standardni odklon	0,41	1,34
	Koeficient variacije (%)	0,34	0,98
Št. semen na strok	Povprečje	1,53	2,67
	Minimum	0,17	1,16
	Maksimum	2,82	4,90
	Standardni odklon	0,57	0,61
	Koeficient variacije (%)	0,45	0,47
Masa 100 semen (g)	Povprečje	28,02	35,77
	Minimum	6,00	14,98
	Maksimum	54,00	51,49
	Standardni odklon	7,72	6,91
	Koeficient variacije (%)	5,75	5,47

Največji koeficient variacije in s tem največjo variabilnost smo iz podatkov obeh poskusov izračunali za maso 100 semen (BF = 5,75 %; KIS = 5,47 %). V ta podatek so poleg zdravega semena všeta tudi nagubana, nekaljiva semena in polni stroki. Nekatere rastline RIL v poskusu na KIS so imele od vsega pridelka semen 45–48 % slabih semen (RIL 20, RIL 18, RIL 32), RIL 76 jih je imel 67 %, RIL 27 pa je imel kar 3,7-krat več slabih semen kot dobrih. Variabilnost ostalih prikazanih lastnosti se je gibala med 0,34 % (št. strokov na rastlino pri BF) in 2 % (št. dni do pojava strokov pri KIS).

Moč linearne povezanosti med pari dvanajstih lastnosti smo ocenili s Pearsonovim korelacijskim koeficientom (Preglednica 20). Opisne lastnosti, velikost brakteole, barvo jadra, žilnatost jadra, tip rasti, barvo stebela, barvo stroka in barvo semena, smo pretvorili v numerične vrednosti in jih tako vključili v analizo. Pri obeh poskusih z RIL smo ugotovili, da so barve rastlinskih organov v korelaciji. V korelaciji sta tudi št. dni do cvetenja in št. dni do pojava strokov. Analiza podatkov s poskusa na BF kaže, da s številom dni do pojava strokov korelira št. strokov na rastlino in št. semen na strok. Masa 100 semen pa je v korelaciji z barvo jadra, barvo stroka in barvo semena. Analiza podatkov na KIS kaže, da je masa 100 semen v korelaciji s tipom rasti in št. semen na strok.

Preglednica 20: Ocena povezanosti morfoloških znakov, pridobljena s Pearsonovim korelacijskim koeficientom. Statistično značilne razlike pri * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; DC – št. dni do cvetenja; VB – velikost brakteole; BJ – barva jadra; ŽJ – žilnatost jadra; TR – tip rasti; BSte – barva stebila; DS – št. dni do strokov; BStr – barva stroka; StrR – št. strokov na rastlino; BSe – barva semena; SS – št. semen na strok; MSe – masa 100 semen.

Table 20: Pearson correlation coefficient for the estimation of the morphological trait correlation. Statistically significant differences at * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; DC – days to flowering; VB – size of bracteole; BJ – wing color; ŽJ – wing surface; TR – growth habit; BSte – stem color; DS – end of flowering; BStr – pod color; StrR – pods per plant; BSe – seed color; SS – seed per pod; MSe – 100-seed weight.

Lastnost	Poskus	DC	VB	BJ	ŽJ	TR	BSte	DS	BStr	StrR	BSe	SS	MSe
DC	BF	1	*					**					
	KIS	1						***					
VB	BF	0,2609	1				*						
	KIS	-0,1712	1		*		*						
BJ	BF	-0,1186	0,0599	1	*		***		**		***		**
	KIS	0,053	0,1295	1	***	*	***		***		***		
ŽJ	BF	0,2001	0,0382	0,2574	1		**	*					
	KIS	-0,1727	0,2341	0,3822	1		***		***				
TR	BF	0,0078	0,2236	-0,0808	-0,0354	1							
	KIS	0,0448	0,158	-0,2831	0,0692	1					**		*
BSte	BF	0,1395	0,2708	0,5116	0,3698	0,1666	1		***		**		
	KIS	-0,1727	0,2341	0,549	0,4947	-0,0968	1		***		**		
DS	BF	0,3792	-0,0467	0,1844	0,3062	-0,1004	0,1699	1		**		*	
	KIS	0,7564	-0,1087	-0,0135	-0,0003	0,0986	-0,1913	1					
BStr	BF	-0,1091	-0,0087	0,3618	0,2209	0,1154	0,4281	0,1449	1		*		*
	KIS	-0,0478	0,0202	0,3969	0,5243	-0,0063	0,6397	-0,1269	1				
StrR	BF	-0,2442	-0,2288	-0,055	-0,1938	0,0492	-0,1277	-0,3301	-0,0546	1			
	KIS	0,212	-0,1529	0,0219	-0,0972	0,1358	-0,1237	0,1584	-0,0135	1		**	

Se nadaljuje.

Nadaljevanje preglednice 20.

Lastnost	Poskus	DC	VB	BJ	ŽJ	TR	BSte	DS	BStr	StrR	BSe	SS	MSe
BSe	BF	-0,0793	0,2022	0,7209	0,0093	-0,036	0,3789	-0,0396	0,2678	0,2038	1	*	**
	KIS	-0,0303	0,1132	0,7684	-0,0072	-0,3045	0,3186	-0,0316	0,0132	0,0797	1		
SS	BF	-0,1857	0,0443	0,1074	-0,2081	-0,1124	-0,1194	-0,2717	-0,1193	0,1333	0,2839	1	
	KIS	-0,0156	0,0853	0,1562	0,2292	0,0565	0,09	0,0561	0,0672	-0,3355	0,0875	1	***
MSe	BF	0,1633	0,0084	-0,328	-0,0668	-0,0269	-0,2064	0,1275	-0,2647	-0,1321	-0,3278	-0,2454	1
	KIS	-0,0034	0,0637	0,1084	-0,0863	-0,2654	0,0601	-0,2311	-0,0299	-0,0004	0,0905	-0,3831	1

Za izračun statističnih razlik med povprečij numeričnih lastnosti, na katere lahko vpliva suša, smo RIL razporedili v homogene skupine glede na barvo semena (1 – bela, 3 – pisana, 4 – rjava in 5 – črna) (Preglednica 21). Statistično značilne razlike so se z LSD testom v poskusu na BF pokazale med povprečij mase 100 semen med skupinama 1 – 3 in med skupinama 1 – 5. Značilne razlike števila semen na strok so se pokazale med skupinama 1 in 5. V poskusu na KIS so bile značilne razlike v št. semen na strok med skupinama 1 – 3 in 3 – 4.

Preglednica 21: Fisher-jev test najmanjših značilnih razlik med povprečji različnih lastnosti dveh homolognih skupin RIL na podlagi barve semen, s podatki poskusa na BF (A) in KIS (B). Statistično značilne razlike so prikazane z različnimi črkami pri 95 % LSD. 1 – bela, 3 – pisana, 4 – rjava in 5 – črna. DC – št. dni do cvetenja; MSe – masa 100 semen; StrR – št. strokov na rastlino; SS – št. semen na strok; DC – št. dni do cvetenja; ETR 0/10/23 BF oz. 0/14/17 KIS – hitrost transporta elektronov v 0./10./23. dnevu suše iz poskusa na Biotehniški fakulteti oz. 0./14./17. dnevu suše na Kmetijskem inštitutu Slovenije; Fv'/Fm' 0/10/23 BF oz. 0/14/17 KIS – potencialna fotokemična učinkovitost elektronov 0./10./23. dan suše iz poskusa na Biotehniški fakulteti oz. 0./14./17. dnevu suše na Kmetijskem inštitutu Slovenije.

Table 21: Fisher's the least significant differences test between means of different traits of two homologous groups of RILs based on their seed coat color from two experiments, BF (A) and KIS (B). Different letters (a, b, c) represent statistically significant differences at 95 % LSD. 1 – white, 3 – colorful, 4 – brown, 5 – black. MSe – 100-seed weight; StrR – pots per plant; SS – seed per pot; DC – days to flowering; ETR 0/10/23 BF or 0/14/17 KIS – electron transport rate at 0./10./23. days of drought from experiment at Biotechnical faculty or 0./14./17. days of drought from experiment at Agricultural institute of Slovenia; Fv'/Fm' 0/10/23 BF oz. 0/14/17 KIS – potential photochemical efficiency 0./10./23. days of drought from experiment at Biotechnical faculty or 0./14./17. days of drought from experiment at Agricultural institute of Slovenia.

A)

Barva semena	Število RIL – BF	MSe	StrR	SS	DC	ETR 0 BF	ETR 10 BF	ETR 23 BF	Fv'/Fm' 0 BF	Fv'/Fm' 10 BF	Fv'/Fm' 23 BF
1	32	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a
3	17	a	a	ab	a	a	a	a	a	a	a
4	3	ab	a	ab	a	a	a	a	a	a	a
5	14	a	a	b	a	a	a	a	a	a	a

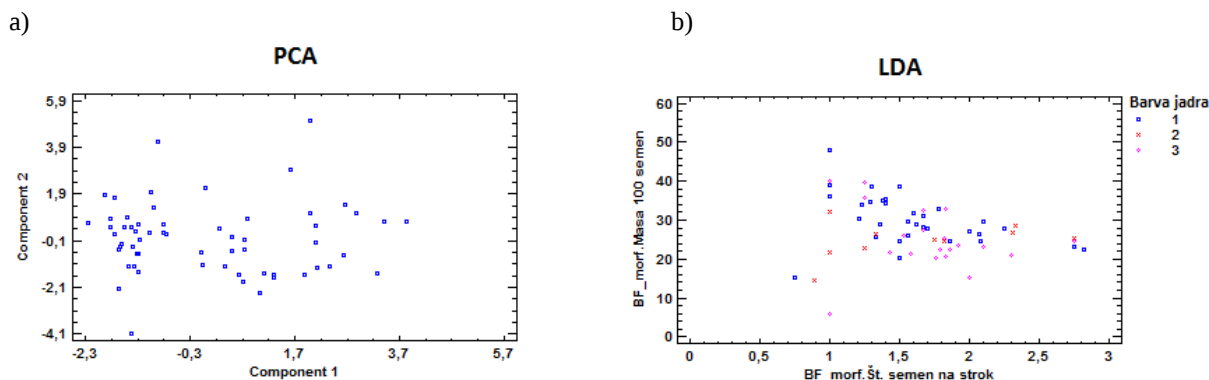
B)

Barva semena	Število RIL – KIS	MSe	StrR	SS	DC	ETR 0 KIS	ETR 14 KIS	ETR 17 KIS	Fv'/Fm' 0 KIS	Fv'/Fm' 14 KIS	Fv'/Fm' 17 KIS
1	41	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
3	19	a	a	b	a	a	a	a	a	a	a
4	5	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
5	14	a	a	ab	a	a	a	a	a	a	a

Za razvrščanje rastlin RIL v morebitne skupine smo uporabili PCA- in LDAmetodo. Podatke iz poskusa na BF in KIS smo obdelali ločeno. V PCA smo vključili vseh 12 lastnosti. Iz podatkov poskusa na BF so prve tri komponente pojasnile slabih 53 % variacije (Slika 20a). Prva komponenta je pojasnjevala 22,9 %, druga 18,6 % in tretja 11,3 % variance. K prvi komponenti sta največ prispevali lastnosti barva jadra in masa 100 semen ter RIL4, RIL7, RIL9, RIL13, RIL27, RIL30, RIL35, RIL37, RIL53, RIL73, RIL82, RIL83, RIL85 in RIL89. K drugi komponenti sta največ prispevali lastnosti št. dni do cvetenja in št. semen na strok ter RIL25, RIL42, RIL59, RIL70, RIL74 in RIL90. K tretji

komponenti pa sta največ prispevali lastnosti velikost brakteole in št. dni do strokov ter RIL 1, 9, 13, 24, 30, 31, 59, 70, 73, 74, 79, 86, 89 in 90.

Z istimi podatki iz poskusa na BF smo opravili tudi LDA, kjer smo podatke razvrstili glede na barvo jadra. S postopkom lahko na podlagi ostalih izbranih lastnosti predvidimo barvo jadra. Dve diskriminatorsni funkciji, št. semen na strok in masa 100 semen, s $p < 0,05$ sta bili statistično različni pri 95% stopnji zaupanja. Prva komponenta je pokrivala 81,2 % variacije, druga pa 18,9 % (Slika 20b).

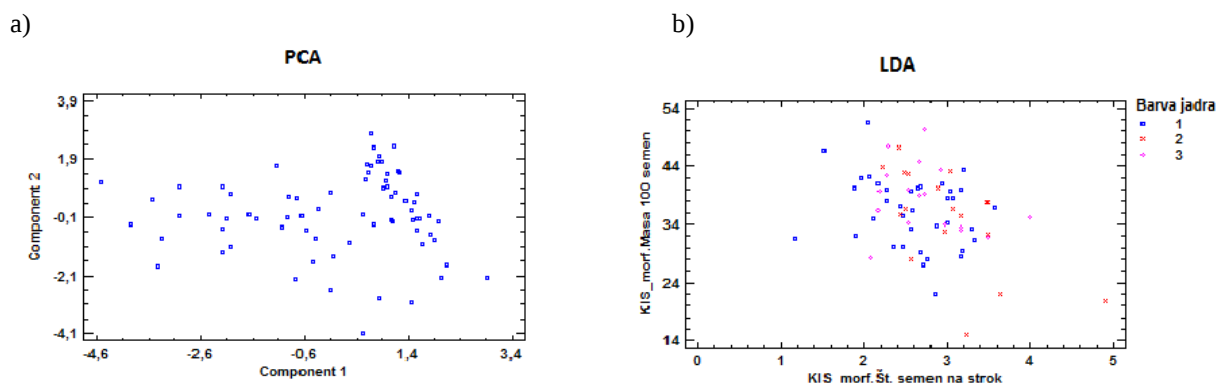


Slika 20: Razvrstitev rastlin RIL s poskusa BF glede na morfološke parametre, s pomočjo metod PCA (a) in LDA (b).

Figure 20: Arrangement of RILs from BF experiment according to morphological traits with PCA (a) and LDA (b) methods.

Podatki iz poskusa na KIS so podali podobne rezultate. Iz podatkov 12 morfoloških lastnosti so prve tri komponente pojasnile 55 % variacije (Slika 21a). Prva komponenta je pojasnjevala 24,4 %, druga 15,6 % in tretja 14,9 % variance. K prvi komponenti sta največ prispevali lastnosti št. dni do cvetenja in barva stebila ter RIL4, RIL9, RIL15, RIL25, RIL27, RIL38, RIL53, RIL80, RIL83 in RIL89. K drugi komponenti sta največ prispevali lastnosti št. dni do cvetenja in velikost brakteole ter RIL5, RIL7, RIL13, RIL15, RIL21, RIL38, RIL65, RIL69 in RIL91. K tretji komponenti pa sta največ prispevali lastnosti tip rasti in masa 100 semen ter RIL4, RIL27, RIL33, RIL35, RIL37, RIL58, RIL68, RIL70 in RIL90.

Tudi pri KIS smo vse ostale podatke razvrstili glede na barvo jadra. Diskriminatorsni funkciji, št. semen na strok in masa 100 semen, s $p < 0,05$ sta bili statistično različni pri 95% stopnji zaupanja. Prva komponenta je pokrivala 89,4 % variacije, druga pa 10,6 % (Slika 21b).



Slika 21: Razvrstitev rastlin RIL s poskusa KIS glede na morfološke parametre s pomočjo metod PCA (a) in LDA (b).

Figure 21: Arrangement of RILs from KIS experiment according to morphological traits with PCA (a) and LDA (b) methods.

4.2.2 Vrednotenje fizioloških lastnosti

Za pridobitev podatkov o razlikah v fizioloških lastnostih med RIL smo v poskusih na BF in na KIS vrednotili fiziološke parametre, pri katerih sta se razlikovali starševski liniji. Na rastlinah RIL smo izmerili vodni potencial (VP), potencialno fotokemično učinkovitost (F_v'/F_m') in hitrost transporta elektronov (ETR). Rezultati povprečnih vrednosti s standardno napako in statistično značilnimi razlikami med dnevi suše posamezne RIL, ki so označene z različno malo črko, so prikazani v prilogi K. V povprečnih vrednostih VP, F_v'/F_m' in ETR, v določenem dnevu suše, se rastline RIL niso razlikovale med seboj.

Za poskus v rastlinjaku na BF je statistična analiza potrdila, da značilnih razlik v vsebnosti vode v substratu (VVS) med RIL ni bilo. Statistično značilne razlike so se pokazale v VVS med dnevi suše ($p < 0,05$), v katerih smo izvajali meritve (Priloga L1). Število dni v suši je značilno vplivalo na spremembo vodnega potenciala (VP). Razlike se v VP med dnem pred začetkom suše in 10. dnem niso pokazale, medtem ko so bile pri večini rastlin RIL med 0. dnem in 23. dnem razlike statistično značilne ($p < 0,5$; 0,01; 0,001). Prav tako so bile pri teh rastlinah RIL razlike tudi v VP med 10. in 23. dnem ($p < 0,5$; 0,01; 0,001), razen pri rastlinah RIL19, RIL31, RIL54, RIL56, RIL59, RIL62, RIL63, RIL72, RIL73, RIL77 in RIL78. Dnevi suše na VP pri RIL3, RIL5, RIL6, RIL8, RIL9, RIL16, RIL17, RIL20, RIL22, RIL26, RIL27, RIL28, RIL34, RIL43, RIL44, RIL46, RIL48, RIL58, RIL61, RIL64 in RIL71 niso vplivali.

Dnevi suše (oz. VVS) so prav tako vplivali na F_v'/F_m' in ETR rastlin RIL v poskusu na BF (Priloga M1 in N1). Značilne razlike v F_v'/F_m' rastlin RIL med 0. in 10. dnem so bile le pri RIL90 in RIL91 ($p < 0,01$), kjer pa drugih razlik med dnevi suše ni bilo. Ugotovili smo razlike med 0. in 23. dnem ($p < 0,001$; pri RIL66 $p < 0,05$) ter med 10. in 23. dnem suše ($p < 0,001$), pri rastlinah RIL10, RIL12, RIL13, RIL14, RIL15 in RIL66. Pri rastlinah RIL79 ($p < 0,001$), RIL86 ($p < 0,05$) in RIL88 ($p < 0,01$) so bile razlike samo med 10. in 23. dnem suše. Statistično značilne razlike v ETR med 0. in 10. ($p < 0,01$) ter 0. in 23. dnem suše ($p < 0,05$) smo ugotovili pri RIL69, samo med 0. in 23. dnem suše ($p < 0,05$) pa pri RIL79. Pri ostalih rastlinah RIL razlik med dnevi suše v ETR ni bilo.

Tudi v poskusu v rastlinjaku na KIS značilnih razlik v VVS med rastlinami RIL ni bilo. Dnevi suše so značilno vplivali na VP v rastlinah RIL v poskusu na KIS (Priloga L2). Rezultati so pokazali značilne razlike v VP med 0. in 14. dnem pri večini rastlin RIL ($p < 0,5$; 0,01; 0,001). Med 0. in 17. dnem suše ($p < 0,001$) večinoma ni bilo značilnih razlik v VP, bile so le pri rastlinah RIL15, RIL22, RIL26 ($p < 0,01$), RIL89 in RIL90 ($p < 0,05$). Razlike v VP smo ugotovili pri rastlinah RIL2, RIL53, RIL82 in RIL85 s 95,0% stopnjo zaupanja, pri RIL34, RIL65, RIL70, RIL77, RIL88 in RIL89 z 99,0% stopnjo zaupanja ter pri RIL3, RIL9, RIL17, RIL24, RIL31, RIL39, RIL41, RIL55, RIL62, RIL80, RIL83 in RIL84 z 99,9 % stopnjo zaupanja.

Pri merjenju fluorescence klorofila smo v vsakem dnevu suše izmerili svetlobno jakost in temperaturo lista. Dan pred sušo je bila jakost svetlobe $52 \pm 1,8 \mu\text{M PAR}$ in temperatura lista $31\text{--}37^\circ\text{C}$, 10. dan $31 \pm 1,2 \mu\text{M PAR}$ in $21\text{--}25^\circ\text{C}$ ter 23. dan $28 \pm 0,5 \mu\text{M PAR}$ in $26\text{--}28^\circ\text{C}$. Za razliko od poskusa na BF, so v poskusu na KIS dnevi suše močno vplivali na F_v'/F_m' in ETR, saj lahko z le 0,01 % tveganjem trdimo, da so bile razlike med povprečji teh dveh parametrov vseh RIL statistično značilne med vsemi dnevi suše (Priloga M2 in N2). Na rezultate značilno vplivajo tako rastline RIL ($p < 0,05$) kot tudi dnevi suše ($p < 0,0001$), prav tako so razlike med dnevi suše v F_v'/F_m' in ETR pri rastlinah RIL značilno različne. Razlike v F_v'/F_m' rastlin RIL med 0. in 14. dnem ($p < 0,5$; 0,01; 0,001) so bile pri rastlinah RIL6, RIL7, RIL9, RIL10, RIL13, RIL17, RIL19, RIL20, RIL21, RIL22, RIL27, RIL28, RIL32, RIL35, RIL36, RIL37, RIL39, RIL43, RIL46, RIL55, RIL57, RIL63, RIL71, RIL76, RIL80, RIL82, RIL84 in RIL86. Med 0. in 17. dnem suše so bile razlike v F_v'/F_m' pri rastlinah RIL68, RIL77 in RIL83 s 95,0% stopnjo zaupanja, pri RIL15, RIL22 in RIL26 z 99,0% stopnjo zaupanja in pri RIL9, RIL19, RIL43, RIL46 ter RIL84 z 99,9% stopnjo zaupanja. Ugotovili smo tudi razlike med 14. in 17. dnem suše pri $p < 0,05$, pri rastlinah RIL7, RIL28, RIL31, RIL35 in RIL55, in pri $p < 0,01$, pri rastlinah RIL21 in RIL68. Značilne razlike v ETR med dnevi suše so bile ugotovljene le pri nekaterih rastlinah RIL. Med 0. in 4. dnem suše so bile razlike pri rastlinah RIL5, RIL24 in RIL61 s 95,0% stopnjo zaupanja, pri RIL21 in RIL79 z 99,0 % stopnjo zaupanja in pri RIL25, RIL68 ter RIL78 z 99,9% stopnjo zaupanja. Značilne razlike v ETR med 0. in 17. dnem suše v poskusu na KIS so se pokazale samo pri rastlinah RIL9 ($p < 0,01$), med 14. in 17. dnem pa pri rastlinah RIL55, RIL68, RIL78, RIL79 pri $p < 0,001$.

4.2.3 Analiza z molekulskimi markerji

Rastline RIL smo od skupno 477 mikrosatelitov in 256 kombinacij AFLP, s katerimi smo okarakterizirali starševski liniji, testirali s 102 polimorfnima mikrosatelitoma in 27 polimorfnimi kombinacijami markerjev AFLP. Uspešnost polimorfizmov mikrosatelitov in markerjev AFLP je znašala 17,6 %. Pri preverjanju ponavljivosti testa raznolikosti med starševskima linijama z ostalimi tipi molekulskih markerjev (ISSR, RAPD, delno specifični, SRAP, RGA) nismo dobili pričakovanih produktov pomnoževanja, zato teh nismo uporabili v analizi potomcev (RIL).

4.3 GENSKO KARTIRANJE IN ANALIZA QTL

4.3.1 Izdelava vezane genske karte

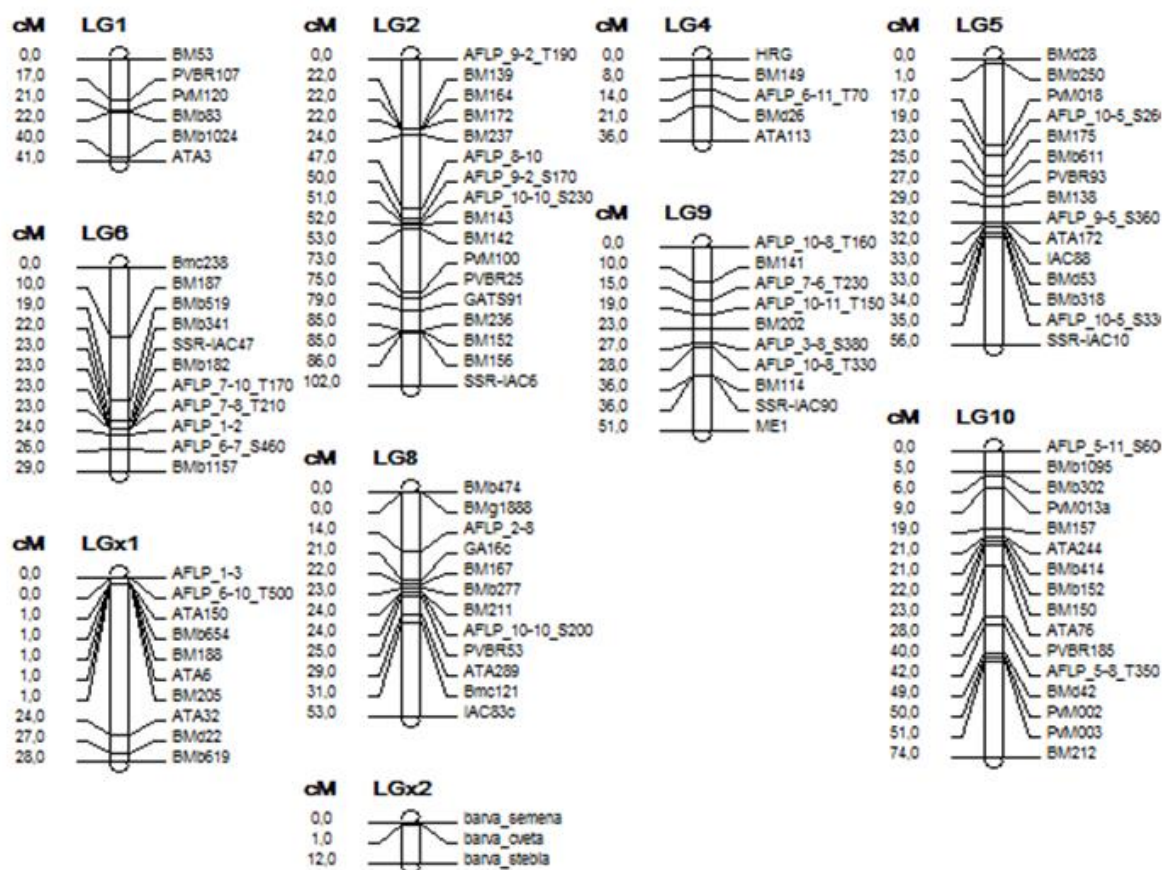
Relativno pozicijo molekulskih in morfoloških markerjev na vezanih skupinah navadnega fižola smo določili z uporabo postopka genskega kartiranja. Z uporabo računalniškega programa JoinMap 4.0 in s podatki analize molekulskih markerjev smo pridobili vezano gensko karto navadnega fižola. Karta je vsebovala 133 polimorfni markerjev. Od tega je bilo 27 markerjev AFLP, 102 mikrosatelita, 4 markerji so bili morfološki. Segregacijski odklon je bil pri 30 markerjih pri 95% stopnji zaupanja statistično značilno različen od pričakovanega 1 : 1 razmerja, a smo jih kljub temu vključili v analizo vezanosti (Priloga O). Z izbrano oceno neodvisnosti LOD = 3,5 smo pridobili markerje, razporejene v 21 vezanih skupin. Od tega je bilo 8 skupin, v katerih je bil prisoten samo en marker. 26 markerjev je bilo nerazvrščenih. Nekatere med njimi, markerje, ki so bili sami v skupini, in nekatere druge markerje smo ročno prestavili v vezano skupino, v katero so sodili po literaturi in glede na markerje iz druge skupine, s katerimi so bili najbolj povezani. S tem smo dobili 10 LG s 116 vezanimi markerji. Razdalje na genski karti smo izračunali s funkcijo Kosambi, končno karto pa smo preračunali z metodo najmanjših kvadratov. Za razvrščanje parov markerjev smo uporabili mejne vrednosti ocene neodvisnosti z začetkom pri LOD = 3 in koncem pri LOD = 10 s korakom 1. Za vezavo markerjev smo uporabili frekvenco rekombinacije, manjšo od 0,4, in LOD, večji od 1,00. Markerje smo razvrstili v dveh krogih, kjer smo z drugim krogom razvrstitev prvega kroga samo fiksirali. Končno karto sestavlja 10 LG (LG1, LG2, LG4, LG5, LG6, LG8, LG9, LG10, LGx1 in LGx2) s 105 vezanimi markerji (Preglednica 22). Od vseh markerjev, razvrščenih v vezane skupine, je bilo 23 markerjev AFLP, 79 mikrosatelitov in 3 morfološki markerji (Slika 22).

Zastopanost posamezne skupine z markerji je bila od 3 (LGx2) do 17 (LG2). Povprečno je posamezna vezana skupina pokrita z 10,5 markerja. Skupna dolžina karte znaša 486,27 cM, kar je povprečno slabih 49 cM na vezano skupino. Skupine so dolge od 12,63 cM (LGx2) do 102,28 cM (LG2). Povprečna razdalja med markerji je 4,79 cM.

Preglednica 22: Prikaz števila markerjev AFLP, mikrosatelitov (SSR) in morfoloških markerjev po vezanih skupinah (LG), dolžine posamezne vezane skupine ter povprečne razdalje med markerji po vezanih skupinah genske karte navadnega fižola.

Table 22: Number of AFLP, microsatellites, and morphological markers and their average distances per linkage group, and length of linkage groups of the common bean genetic map.

LG	AFLP	SSR	Morfološki markerji	Št. markerjev	Dolžina LG (cM)	Povpr. razdalja med markerji SSR (cM)	Povpr. razdalja med markerji (cM)
LG1	0	6	0	6	41,85	6,98	6,98
LG2	4	13	0	17	102,28	7,87	6,02
LG4	1	4	0	5	36,01	9,00	7,20
LG5	3	12	0	15	56,51	4,71	3,77
LG6	4	7	0	11	29,16	3,65	2,65
LG8	2	10	0	12	53,14	4,83	4,43
LG9	5	5	0	10	51,40	10,28	5,14
LG10	2	14	0	16	74,70	5,34	4,67
LGx1	2	8	0	10	28,59	3,57	2,86
LGx2	0	0	3	3	12,63	0	4,21
Skupaj	23	79	3	105	486,27	5,62	4,79



Slika 22: Vezana genska karta populacije RIL, potomcev križanja sorte 'Tiber' × 'Starozagorski'. Desno so podana imena AFLP, mikrosatelitov in morfoloških markerjev z njihovimi razdaljami na levi strani (cM).

Figure 22: Genetic linkage map of RIL population developed from the cross 'Tiber × Starozagorski čern'. On the right side of chromosome AFLP, microsatellites and morphological markers are indicated with their distances on the left side (cM).

4.3.2 Analiza QTL

Povezanost med kvantitativnimi lastnostmi fenotipom in genotipom smo določili s pomočjo programa Windows QTL Cartographer. Od 133 molekulskih markerjev smo jih kartirali 105 in povezali z 28 kvantitativnimi lastnostmi, pridobljenimi iz poskusa BF in KIS (Slika 23).

Skupaj smo določili 18 QTL, povezanih z 10 različnimi kvantitativnimi lastnostmi (LOD > 2) (Slika 23, Preglednica 23). Te lastnosti so št. dni do cvetenja – BF, št. dni do strokov – BF in KIS, št. strokov na rastlino – BF, št. semen na strok – BF, masa 100 semen – BF, vodni potencial – kontrola – KIS, vodni potencial suša 2 – BF in KIS ter hitrost prenosa elektronov – suša 1 – BF. Locirani so na petih različnih vezanih skupinah, in sicer LG1, LG2, LG5, LG6 in LG9. Od skupno 28 kvantitativnih lastnosti, 18 lastnostim: št. dni do cvetenja – KIS, št. strokov na rastlino – KIS, št. semen na strok – KIS, masa 100 semen – KIS, vodni potencial – kontrola – BF, vodni potencial – suša 1 – BF in KIS, elektronov – kontrola – BF in KIS, hitrost prenosa elektronov – suša 1 – KIS, elektronov – suša 2 – BF

in KIS ter lastnostim v povezavi s potencialno fotokemično učinkovitostjo (F_v'/F_m') nismo mogli določiti QTL ($LOD < 2$). Na vseh petih LG so QTL povezani s št. dni do cvetenja in/ali št. dni do strokov in/ali z lastnostmi povezanimi s pridelkom, na LG2, LG5 in LG6 pa tudi s fiziološkimi lastnostmi povezanimi s sušo. Večina QTL je povezanih s podatki kvantitativnih lastnosti iz samo enega poskusa (BF), QTL za št. dni do strokov in vodni potencial pa so povezani s podatki iz obeh poskusov. Fenotipska varianca (R^2) pojasnjena z enim QTL variira od 8,1 % (SeStr-BF na LG9) do 40,2 % (M100Se-BF na LG1), LOD vrednosti pa od 2,15 (DStr-KIS na LG6) do 13,09 (M100Se-BF na LG1) (Preglednica 23).

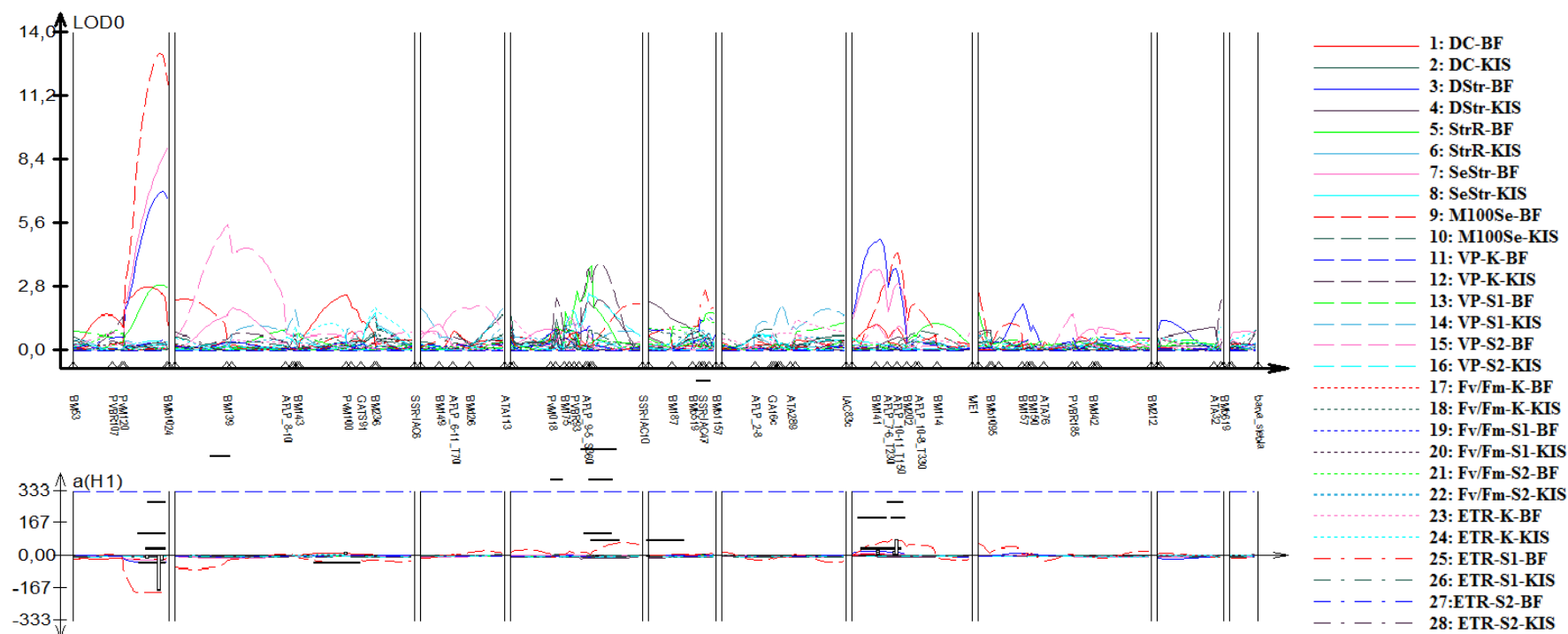
Na LG1 sta s QTL najbolj povezana mikrosatelitna markerja BMb83 in BMb1024. Zadnji je QTL najbližji, od lastnosti DC-BF, DStr-BF, StrR-BF in M100Se-BF je oddaljen 2,34–8,34 cM. BMb83 je od naštetih QTL oddaljen 9,19–15,19 cM. Največ fenotipske variabilnosti je pojasnjene za lastnost M100Se-BF (40,2 %), najmanj pa za StrR-BF (13,7 %).

Na najdaljši, 102 cM dolgi LG2, sta kartirana dva QTL, in sicer DC-BF ter VP_S2-BF. Prvemu je najbližje mikrosatelitni marker PvM100, ki je od QTL oddaljen za 0,92 cM. Pojasnjene je 9,5 % fenotipske variabilnosti lastnosti. Fiziološka lastnost, vodni potencial, merjen na BF, je povezana s tremi mikrosatelitnimi markerji (BM139, BM164 in BM172), ki so tesno povezani, in so od QTL oddaljeni 0,54–0,59 cM. Pojasnjene je 22,3 % fenotipske variabilnosti lastnosti.

Pet QTL je kartiranih na LG5 z lastnostmi DStr-KIS, StrR-BF, VP_S2-KIS in VP_K-KIS, ki je povezana z dvema QTL. QTL DStr_KIS in enem od vrhov VP_K-KIS je najbolj povezan molekulski marker AFLP_10-5_S330. Od njiju je oddaljen 1,69 cM in pojasni 14,2 % oz. 22,6 % fenotipske variabilnosti lastnosti. QTL StrR-BF je najbližje mikrosatelitni marker BMb318 v razdalji 0,13 cM in pojasni 13,0 % fenotipske variabilnosti lastnosti. Trije markerji ATA172, IAC88 in BMd53 so najbolj povezani s QTL VP_S2-KIS v razdalji 0,1–0,9 cM. Pojasnjene je 12,3 % fenotipske variabilnosti lastnosti.

Najkrajša vezana skupina od petih LG s QTL, LG6 z dolžino 29 cM, ima locirana dva QTL. Prvi je DStr-KIS, ki je vezan na mikrosatelitni marker Bmc238, s katerim je pojasnjene 9,1 % fenotipske variabilnosti lastnosti. Drugi, s sušo povezan QTL, je hitrost prenosa elektronov v suši 1, merjeni na BF. QTL je povezan s petimi markerji, ki so tesno povezani, in sicer SSR-IAC47, BMb182, AFLP_7-10_T170, AFLP_7-8_T210, AFLP_1-2, oddaljenih 0,11–0,54 cM od QTL. Pojasnjene je 12,7 % fenotipske variabilnosti lastnosti.

Na LG9 je kartiranih pet QTL, od tega sta dva QTL za lastnost DStr_BF in za SeStr-BF. Prvemu QTL DStr-BF in QTL SeStr_BF je najbližje vezan mikrosatelitni marker BM141 v razdalji 0,37 cM, ki pojasni 15,4 % oz. 11,0 % fenotipske variabilnosti lastnosti. Drugemu QTL obeh lastnosti je najbližje vezan marker AFLP_10-11_T150 v razdalji 1,17 cM oz. 0,17 cM, ki pojasni 11,2 % oz. 8,1 % fenotipske variabilnosti lastnosti. Na LG9 je lociran tudi QTL lastnosti M100Se-BF, ki je vezan z markerjem AFLP_10-11_T150 v razdalji 0,17 cM, in pojasni 8,2 % fenotipske variabilnosti lastnosti.



Slika 23: Graf prikazuje povezanost 28 kvantitativnih lastnosti z molekulskimi markerji na 10 vezanih skupinah. QTL so vrhovi pri LOD > 2. DC – št. dni do cvetenja, DStr – št. dni do pojava strokov, StrR – št. strokov na rastlino, SeStr – št. semen na strok, M100Se – masa 100 semen, VP – vodni potencial, Fv'/Fm' – potencialna fotokemična učinkovitost, ETR – hitrost transporta elektronov, BF – poskus na Biotehniški fakulteti, KIS – poskus na Kmetijskem inštitutu Slovenije, K – kontrolne rastline, S1/S2/S3 – rastline v suši 1/2/3.

Figure 23: Graf is showing 28 quantitative traits linked with molecular markers on 10 linkage groups. QTLs are picks at LOD > 2. DC – days to flowering, DStr – days to pods, StrR – pods per plant, SeStr – seeds per pods, M100Se – 100 seed mas, VP – water potential, Fv'/Fm' - potential photochemical efficiency, ETR – electron transport rate, BF- experiment at Biotechnical faculty, KIS – experiment at Agricultural institute of Slovenia, K – control plants, S1/S2/S3 – plants in drought 1/2/3.

Preglednica 23: QTL petih kvantitativnih lastnosti rastlin RIL, potomcev sorte 'Tiber' × 'Starozagorski črn' pred sušo (K) in v dveh časovnih stopnjah suše (S1, S2): iz poskusov na BF ter KIS.

Table 23: QTLs of five quantitative traits of RILs from 'Tiber' × 'Starozagorski' before drought (K) and at two stages of drought of experiments at BF and KIS.

QTL – Informacije							Mejne pozicije (cM)				Pozicija markerja (cM)				
Lastnost	LG	Pozicija (cM)	LOD	Aditivni efekt	Domin. efekt	R ²	LOD1 _L	LOD1 _R	LOD2 _L	LOD2 _R	Position	1_L	1_R	2_L	2_R
DC-BF	LG1	32,01	2,780	-18,6203	0	0,159	29,1	39	21	39	BMb83 (22,82), BMb1024 (40,35)	BMb83 (22,82)	BMb1024 (40,35)	BMb83 (22,82)	BMb1024 (40,35)
DC-BF	LG2	73,01	2,471	14,2583	0	0,095	60,2	78,3	53	84,5	PvM100 (73,93)	BM142 (53,97)	PVBR25 (75,11), GATS91 (79,33)	BM142 (53,97)	PVBR25 (75,11), GATS91 (79,33), BM236 (85,17)
DStr-BF	LG1	38,01	7,016	-34,0616	0	0,269	31,8	39	29	39	BMb1024 (40,35)	BMb83 (22,82)	BMb1024 (40,35)	BMb83 (22,82)	BMb1024 (40,35)
DStr-BF	LG9	11,01	4,921	25,7714	0	0,154	4,6	13,9	2,5	14	BM141 (10,64)	AFLP_10-8_T160 (0,00)	BM141 (10,64), AFLP_7-6_T230 (15,01)	AFLP_10-8_T160 (0,00)	BM141 (10,64), AFLP_7-6_T230 (15,01)
DStr-BF	LG9	18,01	3,570	22,2646	0	0,112	15	20,4	15	21,7	AFLP_10-11_T150 (19,18)	AFLP_7-6_T230 (15,01)	BM202 (23,08)	AFLP_7-6_T230 (15,01)	BM202 (23,08)

Se nadaljuje.

Nadaljevanje preglednice 23.

QTL – Informacije							Mejne pozicije (cM)				Pozicija markerja (cM)				
Lastnost	LG	Pozicija (cM)	LOD	Aditivni efekt	Domin. efekt	R ²	LOD1_L	LOD1_R	LOD2_L	LOD2_R	Position	1_L	1_R	2_L	2_R
DStr-KIS	LG5	37,01	2,243	-12,9188	0	0,142	35	45,9	35	52,4	AFLP_10-5_S330 (35,32)	BMb318 (34,14)	SSR-IAC10 (56,51)	BMb318 (34,14)	SSR-IAC10 (56,51)
DStr-KIS	LG6	0,01	2,152	-8,8008	0	0,091	0	14,9	0	22,6	Bmc238 (0,00)	Bmc238 (0,00)	BM187 (10,17), BMb519 (19,59)	Bmc238 (0,00)	BMb341 (22,89)
StrR-BF	LG1	37,01	2,890	-0,1881	0	0,137	28,4	39	23,6	39	BMb1024 (40,35)	BMb83 (22,82)	BMb1024 (40,35)	BMb83 (22,82)	BMb1024 (40,35)
StrR-BF	LG5	34,01	3,724	-0,1892	0	0,130	31,9	42,3	29	36,9	BMb318 (34,14)	BMd53 (33,91), IAC88 (33,14), ATA172 (32,91), AFLP_9-5_S360 (32,61)	AFLP_10-5_S330 (35,32), SSR-IAC10 (56,51)	BM138 (29,89)	AFLP_10-5_S330 (35,32)
SeStr-BF	LG9	11,01	3,553	13,6241	0	0,110	3,1	13,9	0,3	15	BM141 (10,64)	AFLP_10-8_T160 (0,00)	BM141 (10,64), AFLP_7-6_T230 (15,01)	AFLP_10-8_T160 (0,00)	AFLP_7-6_T230 (15,01)

Se nadaljuje.

Nadaljevanje preglednice 23.

QTL – Informacije							Mejne pozicije (cM)				Pozicija markerja (cM)				
Lastnost	LG	Pozicija (cM)	LOD	Aditivni efekt	Domin. efekt	R ²	LOD1_L	LOD1_R	LOD2_L	LOD2_R	Position	1_L	1_R	2_L	2_R
SeStr-BF	LG9	19,01	2,979	11,9187	0	0,081	17,3	22,1	15	22,6	AFLP_10-11_T150 (19,18)	AFLP_7-6_T230 (15,01)	BM202 (23,08)	AFLP_7-6_T230 (15,01)	BM202 (23,08)
M100Se-BF	LG1	37,01	13,090	-183,8722	0	0,402	32,7	39	30,7	39	BMb1024 (40,35)	BMb83 (22,82)	BMb1024 (40,35)	BMb83 (22,82)	BMb1024 (40,35)
M100Se-BF	LG9	19,01	4,326	80,0783	0	0,082	15,7	21	11,1	22	AFLP_10-11_T150 (19,18)	AFLP_7-6_T230 (15,01)	BM202 (23,08)	BM141 (10,64)	BM202 (23,08)
VP-K-KIS	LG5	19,01	2,332	-0,745	0	0,098	17,9	21,5	17,2	22,8	AFLP_10-5_S260 (19,13)	PvM018 (17,49)	BM175 (23,52)	PvM018 (17,49)	BM175 (23,52)
VP-K-KIS	LG5	37,01	3,855	1,0305	0	0,226	34	42,8	34	45,8	AFLP_10-5_S330 (35,32)	BMb318 (34,14)	SSR-IAC10 (56,51)	BMb318 (34,14)	SSR-IAC10 (56,51)
VP_S2-BF	LG2	22,01	5,527	-0,3254	0	0,223	15,9	23	11,9	24	BM172 (22,60), BM164 (22,59), BM139 (22,55)	BM172 (22,60), BM164 (22,59), BM139 (22,55)	BM237 (24,05)	BM172 (22,60), BM164 (22,59), BM139 (22,55)	BM237 (24,05)

Se nadaljuje.

Nadaljevanje preglednice 23.

QTL – Informacije							Mejne pozicije (cM)				Pozicija markerja (cM)				
Lastnost	LG	Pozicija (cM)	LOD	Aditivni efekt	Domin. efekt	R ²	LOD1_L	LOD1_R	LOD2_L	LOD2_R	Position	1_L	1_R	2_L	2_R
VP_S2-KIS	LG5	33,01	2,495	0,3526	0	0,123	30,9	44,7	29	54	ATA172 (32,91), IAC88 (33,14), BMd53 (33,91)	BM138 (29,89), AFLP_9-5_S360 (32,61)	AFLP_10-5_S330 (35,32), SSR-IAC10 (56,51)	BM138 (29,89), AFLP_9-5_S360 (32,61)	AFLP_10-5_S330 (35,32), SSR-IAC10 (56,51)
ETR_S1-BF	LG6	24,01	2,634	5,8906	0	0,127	21,5	26	16	26	SSR-IAC47 (23,90), BMb182 (23,92), AFLP_7-10_T170 (23,93), AFLP_7-8_T210 (23,94), AFLP_1-2 (24,55)	BMb341 (22,89)	AFLP_6-7_S460 (26,56)	BMb519 (19,59)	AFLP_6-7_S460 (26,56)

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Zaradi velike vsebnosti založnih proteinov, visoke energijske vrednosti, vsebnosti vlaknin in vitaminov ter mineralov, je navadni fižol najpomembnejša zrnata stročnica za prehrano ljudi (CGIAR, 2016). Sušni stres močno vpliva na rast in razvoj rastlin navadnega fižola, kar vodi do zmanjšanja količine in kakovosti pridelka, pri hudi suši pa celo do izpada pridelka. Navadni fižol je občutljiv na sušo. Več kot polovico se ga prideluje na površinah, kjer primanjkuje oskrbe z vodo, zato je poznavanje mehanizmov, s katerimi se rastlina odziva na sušni stres, predpogoj za uspešno žlahtniteljsko delo.

Toleranca na sušni stres je poligenska lastnost, zato smo proučevali odziv navadnega fižola na različnih ravneh. Rastline navadnega fižola smo vrednotili z morfološkimi, fenološkimi in fiziološkimi parametri ter genetskimi in osnovnimi biokemijskimi analizami. Z zbranimi rezultati odziva navadnega fižola na sušni stres smo želeli pridobiti čim več različnih markerjev za izdelavo genske karte. Z analizo QTL smo želeli identificirati informativne markerje, ki so povezani z odzivom na sušni stres in ki bodo služili kot kriterij, uporaben pri selekciji tolerantnosti navadnega fižola na sušo.

5.1.1 Vrednotenje lastnosti populacije za kartiranje

Populacijo za kartiranje QTL (RIL) smo pridobili s križanjem starševskih linij navadnega fižola, ki imata različno toleranco na sušni stres na podlagi rezultatov predhodnih raziskav o odzivu različnih genotipov navadnega fižola. Sorta 'Tiber' se je izkazala kot najbolj tolerantna na sušo, saj so Hieng in sod. (2004) ugotovili kasnejši in najmanjši padec vodnega potenciala ter največjo integriteto celične membrane po tretiranju s PEG v primerjavi s sortama 'Zorin' in 'Starozagorski'. Ugotovili so tudi, da se je sorta 'Starozagorski' izkazala kot najmanj tolerantna na sušo, saj se je na sušo najhitreje odzvala z največjim padcem vodnega potenciala in najmanjšo integriteto membrane po tretiranju s PEG v primerjavi s sortama 'Zorin' in 'Tiber'. Razinger in sod. (2010) so ugotovili, da se sorta 'Tiber' s potencialno fotokemično učinkovitostjo odzove na sušo kasneje kot sorta 'Starozagorski'. Na sorti 'Tiber' in 'Starozagorski' so znane tudi druge raziskave v povezavi z odzivom rastlin na sušni stres na področju aktivnosti proteaz (Hieng in sod., 2004; Budič, 2009), diferencialnem izražanju genov v listih (Kavar in sod., 2008) in na ravni proteinov (Zadražnik in sod., 2013).

V predhodnih raziskavah so s križanjem sort 'Tiber' in 'Starozagorski' ter z metodo »selekcije posameznega semena« pridobili 82 rekombinantnih inbridiranih linij F₈-generacije (Zupin in sod., 2014; Šuštar-Vozlič in sod., 2015). Z namenom vrednotiti lastnosti rastlin RIL za pridobitev dovolj različnih podatkov za gensko kartiranje in analizo QTL smo najprej okarakterizirali starševski liniji z različnimi morfološkimi, fenološkimi in fiziološkimi parametri, jih vrednotili s količino pridelka in podatki genetskih analiz z različnimi molekulskimi markerji ter analiz izražanja genov akvaporinov in proteaz. Rastline RIL smo vrednotili z lastnostmi, v katerih sta se razlikovali starševski liniji.

Poskuse s starševskimi linijami smo izvedli v rastni komori na Inštitutu »Jožef Stefan« (IJS 1, IJS 2) in v rastlinjaku na Biotehniški fakulteti v Ljubljani (BF_{SL}), v kontroliranih razmerah. Rastline smo po treh tednih rasti izpostavili suši tako, da smo jih prenehali zalivati. Kontrolne rastline smo skozi celoten poskus zalivali do 70 vol% vode v substratu. Na kontrolnih rastlinah in rastlinah v suši smo opravili štiri meritve v različnih dneh suše: dan pred sušo (S0) in v treh različnih stopnjah suše (S1, S2, S3), glede na vodni potencial rastlin. Rastline, namenjene rehidraciji (RE), smo na dan tretje meritve ponovno zalili in jim na dan četrte meritve izmerili omenjene parametre ter jih vzorčili. Vsa obravnavanja so bila v treh ponovitvah. Merjenje in vzorčenje smo izvedli na tretjem popolnoma razvitem sestavljenem listu rastlin. Morfološke in fenološke lastnosti smo spremljali skozi celoten poskus.

Poskuse z rastlinami RIL smo izvedli v rastlinjaku na Kmetijskem inštitutu Slovenije (KIS) in v rastlinjaku na Biotehniški fakulteti v Ljubljani (BF). Enako kot starševske linije smo rastline RIL po treh tednih rasti izpostavili suši tako, da smo jih prenehali zalivati. Fiziološke meritve smo opravili dan pred sušo in v dveh različnih stopnjah suše (S1, S2). Merjenje smo izvedli na tretjem popolnoma razvitem sestavljenem listu rastlin. Morfološke in fenološke lastnosti smo spremljali skozi celoten poskus. Po zadnjem dnevu merjenja smo rastline ponovno zalili in vrednotili pridelek.

5.1.1.1 Vrednotenje z morfološkimi in fenološkimi parametri ter količino pridelka

Skozi celo rastno dobo rastlin starševskih linij smo ovrednotili skupaj 15 različic petih morfoloških znakov in 5 numeričnih lastnosti v poskusih na KIS ter BF. Po zbranih podatkih smo ugotovili, da se sorti 'Tiber' in 'Starozagorski' razlikujeta v 10 lastnostih: v številu dni do cvetenja in zasnove strokov, barvi semen, barvi jadra, barvi stebela, barvi svežega stroka, tipu rasti, številu strokov na rastlino, številu semen na strok in masi 100 semen. Sorta 'Tiber' je v povprečju zacvetela dva dni prej kot sorta 'Starozagorski', vendar na to ni vplivala suša, saj razlik med kontrolnimi in sušnimi rastlinami pri obeh starševskih linijah ni bilo. Razlik v številu dni do cvetenja v poskusu na BF ni bilo (podatki niso prikazani). Suša v raziskavi Acosta-Diaz in sod. (2009) prav tako ni povzročila razlik v številu dni do cvetenja med osmimi genotipi navadnega fižola z različno toleranco na sušni stres. Značilne razlike so se pokazale med genotipi v številu dni do zrelosti strokov in celotni dolžini reproduktivne faze. Značilne razlike med največkrat uporabljenima starševskima linijama srednjeameriškega genskega sklada v genskih raziskavah navadnega fižola, 'BAT477', ki velja za vir na sušo tolerantnih genov, in 'DOR364', sorta z majhnimi rdeče obarvanimi semeni, so se pokazale pri št. dni do cvetenja in št. dni do zrelosti v treh sezonah (Blair in sod., 2012). Podobno poročajo tudi o značilnih razlikah med sortama v vseh treh sezonah v količini pridelka, količini pridelka na dan in masi semen.

Za vrednotenje 82 RIL smo uporabili morfološke lastnosti, pri katerih sta se razlikovali starševski liniji, in podatke o številu dni do cvetenja, do zasnove strokov, ter vrednotili pridelek. Ugotovili smo, da se rastline RIL razlikujejo tudi v nekaterih lastnostih, ki niso bile opazne pri starševskih linijah in to sta žilnatost jadra in velikost brakteole. Večina RIL (80 %) ni imela žilnatega cvetnega jadra, pri kar 20 % RIL pa smo opazili žilnatost jadra, četudi tega nismo zaznali pri nobeni od starševskih linij. Podobno smo pri 18,8 % RIL

določili majhno velikost brakteole, 51,3 % RIL je imela srednje veliko in 20 % veliko brakteolo, medtem ko smo velikost brakteole pri obeh starševskih linijah določili za majhno. Skoraj polovica RIL (47,5 %) je imela belo obarvano jadro, kot sorta 'Tiber', tretjina (33,8 %) roza, 18,8 % RIL pa je imelo vijolično obarvano jadro, kot jih ima sorta 'Starozagorski'. Pri barvi stebela in stroka je prevladovala zelena (80 % in 92,5 % RIL), le 20 % oz. 8,8 % RIL je imelo na stebelu oz. stroku vijolične proge. Pri 10 % RIL smo zaznali tudi tip rasti I, ki ga pri starševskih linijah nismo določili. 25 % RIL je imelo neomejeno pokončno grmičasto obliko rasti kot sorta 'Starozagorski', dve tretjini pa jih je imelo neomejeno polplezalno obliko rasti kot sorta 'Tiber'. Osnovna barva semena več kot polovice (52 %) RIL je bila bela kot pri sorti 'Tiber', in 17,5 % RIL črna, kot pri sorti 'Starozagorski'. Četrtnina semen je bila pisanih, 5 % pa rjavih. Med morfološkimi znaki, ki označujejo barvo rastlinskega organa, smo v obeh poskusih izračunali statistično značilno korelacijo.

Z osnovno statistiko smo ovrednotili numerična fenološka znaka in parametre, ki odražajo količino pridelka (št. strokov na rastlino, št. semen na strok, masa 100 semen), in rezultate primerjali med poskusoma na BF ter KIS. Število dni do cvetenja se je med poskusoma povprečno razlikovalo za 13 dni, med številom dni do strokov pa je bila 22-dnevna razlika. Variabilnost, ki je sorazmerna s koeficientom variacije, je znašala pri obeh lastnostih in poskusih 1–2 %. Izračunali smo statistično značilno korelacijo med št. dni do cvetenja in št. dni do strokov, saj se z zgodnostjo oz. zamikom cvetenja spremeni tudi št. dni do pojava strokov. Največjo variabilnost (5,47–5,75 %) smo izmerili za maso 100 semen, kar kaže na to, da količina pridelka močno izraža vpliv različnih dejavnikov okolja na rastline. V poskusu na BF je bila razlika med minimalno in maksimalno maso 100 semen kar 48 g, pri KIS, kjer je bil povprečno za približno 7 g večji pridelek semen kot na BF, pa je bila razlika med minimalno in maksimalno maso 100 semen približno 36 g. Variabilnost št. strokov na rastlino in št. semen na strok je znašala 0,34–0,98 (BF) oz. 0,45–0,47 (KIS). Analiza korelacije med lastnostmi je pokazala, da sta zadnji lastnosti v poskusu BF v korelaciji s št. dni do strokov, masa 100 semen pa je v korelaciji z barvo jadra, stroka in semena, kar pomeni, da se te lastnosti v genomu navadnega fižola nahajajo dovolj blizu, da se lahko tudi dedujejo skupaj.

Razlike med numeričnimi lastnostmi med poskusoma na BF in KIS so v veliki meri odraz previsokih temperatur, v času cvetenja rastlin poskusa na BF. V času cvetenja leta 2013, so dnevne temperature presegle 30 °C (Priloga P1), kar je povzročilo, da je temperatura v rastlinjaku BF narasla na od 30 do 40 °C (podatki niso prikazani). Zaradi težav s hlajenjem v rastlinjaku so rastline fižola, ki so prav tako kot na sušo občutljive tudi na visoke temperature, odvrgle cvetove. Mlajši cvetovi so nato zasnovali stroke 13 dni kasneje kot v poskusu na KIS, kjer so bile temperature optimalne. Za primerjavo so v prilogah P2 in P3 prikazani vremenski podatki agrometeorološke postaje KIS2 in Ljubljana Bežigrad za čas poskusa leta 2014. Nekaterim rastlinam so zaradi previsokih temperatur v času poskusa na BF odpadli vsi cvetovi, zato ni prišlo do zasnove strokov in posledično ni bilo mogoče vrednotiti pridelka. Brez pridelka so ostale rastline sorte 'Starozagorski' v suši, močno pa so bile prizadete tudi kontrolne rastline, kar kaže na to, da vzrok ni bila suša, ampak drug stresni dejavnik, v tem primeru previsoke temperature. Interakcije določenega stresa z drugimi dejavniki v okolju, predvsem drugimi stresnimi dejavniki, otežijo selekcijo tolerance na stres (Beebe in sod., 2013a; Yang in sod., 2013). Suša je pogosto v interakciji

z visokimi temperaturami ali s slabo rodovitnostjo tal, ki ovira razvoj korenin (Araújo in sod., 2015). Kombinacija suše, visokih temperatur (povprečna dnevna maksimalna temperatura 38 °C) in dolžina dneva (14 h svetlobe) je v raziskavi Ruiz-Nieto in sod. (2015) povzročila omejeno produkcijo semen.

Zanimiv rezultat smo dobili s Fisher-jevim testom najmanjših značilnih razlik, kjer smo razporedili RIL v homogene skupine glede na barvo semen in izračunali statistične razlike med njimi v numeričnih lastnostih. V poskusu na BF smo ugotovili statistično značilne razlike med povprečni mase 100 semen rastlin z belimi in pisanimi semeni ter med belimi in črnimi semeni. Med skupinama z belimi in črnimi semeni, so bile statistične razlike tudi v št. semen na strok. V poskusu na KIS so bile značilne razlike v št. semen na strok med skupinama RIL z belo in pisano ter pisano in črno barvo semen. Rezultati kažejo na povezanost lastnosti barve semen s količino pridelka, kar smo ugotovili tudi s testom korelacije. Z namenom ugotoviti, ali se glede na barvo rastlinskega organa v rastlinah RIL oblikujejo skupine na podlagi ostalih skupno 12 morfoloških in fenoloških lastnosti ter parametri pridelka, smo naredili linearno diskriminantno analizo (LDA). Rastline RIL smo razporedili glede na barvo jadra, a analiza ni pokazala nobenih definiranih skupin, ki bi nam dale okvir za določanje lastnosti rastlin na podlagi barve jadra. Prav tako tudi z analizo glavnih komponent (PCA) nismo določili nobenih definiranih skupin rastlin RIL. Pri poskusu na BF in KIS so pri analizi PCA prve tri komponente pojasnjevale 53–55 % variabilnosti. Pri 95% stopnji zaupanja sta bili diskriminatorski funkciji, št. semen na strok in masa 100 semen s pomočjo analize LDA značilno različni.

5.1.1.2 Vrednotenje s fiziološkimi parametri

Statistično značilna razlika se je v našem poskusu med kontrolnimi rastlinami in rastlinami v suši pri sorti 'Starozagorski' pokazala že v četrtem dnevu od prenehanja zalivanja ($VP = -0,77 \pm 0,07$ MPa), za razliko od sorte 'Tiber', ki v blagi suši ni kazala nobenih znakov stresa ($VP = -0,46 \pm 0,06$ MPa). Na sušni stres se je sorta 'Tiber' začela odzivati šele kasneje. Statistično značilno različno vsebnost vode v substratu smo izmerili v sedmem dnevu (S2). V močnejši suši, ko je vsebnost vode v substratu padla pod 25 vol%, ni bilo razlik v vodnem statusu rastlin obeh sort (Slika 12, Priloga E). Hieng in sod. (2004) so odziv na sušni stres bolj tolerantne sorte 'Tiber' prav tako zabeležili kasneje, v šestem dnevu suše, kjer je bil vodni potencial rastlin približno -1,25 MPa, medtem ko sta se sorti 'Starozagorski' in 'Zorin' značilno odzvali na sušo že v četrtem dnevu ($VP = -1,24 \pm 0,08$ in $-1,19 \pm 0,06$ MPa).

Rastline navadnega fižola so se na pomanjkanje vode odzvale z zapiranjem listnih rež, kar se je odražalo v močno zmanjšani prevodnosti listnih rež in manjši transpiraciji. Ta učinek smo pri manj tolerantni sorti zaznali v četrtem dnevu suše, pri bolj tolerantni sorti pa v sedmem dnevu suše. Razlike med starševskima linijama niso bile statistično značilne. Podobno so pokazali rezultati netofotosinteze. Zmanjšanje prevodnosti listnih rež je bilo pričakovano, saj je izogib suši eden od glavnih odzivov rastlin na pomanjkanje vode (Rosales in sod., 2012). Odprte listne reže povzročajo izhlapevanje vode iz listov v atmosfero, poleg tega pa istočasno omogočajo prehod CO₂ do fotosinteznega aparata. Zvišanje osmotskega potenciala ali zmanjšanje potenciala vlage v zraku povzroči zapiranje

listnih rež, s čimer rastlina omeji izgubo vode. Omejitev prevodnosti listnih rež vodi do zmanjšanja količine CO₂, ki se asimilira v liste, kar povzroči zmanjšanje delovanja netofotosinteze (Yordanov in sod., 2003).

Merjenje fluorescence klorofila (Fv'/Fm') je široko uporabljena metoda za ugotavljanje delovanja fotosinteznega aparata in dobro orodje za proučevanje odziva rastlin na okoljske stresne dejavnike (Terzi in sod., 2010). Cornic in Briantais (1991) prikazujeta sočasno zmanjšanje stopnje fotosintezne izmenjave plinov in razmerja Fv'/Fm' pri navadnem fižolu v sušnem stresu. Rezultati Santosa in sod. (2009) so pokazali, da zmerina suša ni pospešila foto-inhibicije, saj so tako rastline v suši kot kontrolne rastline navadnega fižola pokazale fotokemično učinkovitost, večjo od 0,725, tudi po desetih dneh suše. V desetem dnevu suše (maksimalna suša) so rastline genotipa A320 in A222 imele višji VP (-0,35 in -0,50 MPa) v primerjavi z rastlinami genotipa 'BAT477', Carioca' in 'Ouro Negro' (-0,67 – -0,77 MPa) (Santos in sod., 2009). Podobno se fotokemična učinkovitost sorte 'Tiber' in 'Starozagorski' do sedmega dne suše, ko so ostali parametri pokazali močan odziv rastlin na sušo, ni bistveno spremenila, saj sedmi dan povprečna vrednost pri obeh starševskih linijah, pri VP = -0,93 ± 0,18 MPa pri sorti 'Tiber' in VP = -1,62 ± 0,17 MPa pri sorti 'Starozagorski', ni padla pod 0,7.

Učinkovitost izrabe vode (WUE) je s fiziološkega vidika definirana kot razmerje med biomaso in/ali produkcijo semen na količino porabljene vode. WUE je večja, če je povečana asimilacija ogljika pri enaki stopnji transpiracije oziroma z zmanjšanjem stopnje transpiracije pri enaki asimilaciji ogljika (Yoo in sod., 2009). Velika WUE lahko bistveno pripomore k produktivnosti rastlin v suši. V pogojih z omejeno količino vode produktivnost ni samo zmanjšana, ampak je zaradi ohranjanja stopnje produktivnosti količina porabljene vode večja (Ruiz-Nieto in sod., 2015). V našem poskusu v začetni suši (VVS = 30 vol%) razlik v WUE med kontrolnimi rastlinami in rastlinami v suši ni bilo. Prav tako ni bilo razlik med starševskima linijama. Značilne razlike smo ugotovili med kontrolnimi rastlinami in rastlinami v suši obeh starševskih linij ter tudi med njima v močnejši suši (VP < -1,0), kjer je vrednost WUE padla pod ničlo. Negativna vrednost WUE kaže na večjo transpiracijo rastlin od netofotosinteze, kar pomeni, da je bila poraba vode v rastlinah večja, kot asimilacija ogljika.

5.1.1.3 Analiza z molekulskimi markerji

Znano je, da je polimorfnost molekulskih markerjev pri populaciji križancev istega genskega sklada lahko zelo majhna (Blair in sod., 2012). V naši raziskavi smo izbrani starševski liniji ovrednotili z različnimi tipi molekulskih markerjev, in sicer SRAP, RGAP, RAPD, ISSR, delno specifičnimi markerji, AFLP in mikrosateliti. Z uporabo različnih molekulskih markerjev smo želeli pridobiti čim bolj enakomerno pokritost genske karte navadnega fižola križancev dveh starševskih linij, ki sta si genetsko zelo sorodna, saj po Marasu (2007) oba sodita v andski genski sklad.

Pri vrednotenju sort 'Tiber' in 'Starozagorski' smo najmanj polimorfizmov dobili pri uporabi markerjev AFLP, delež polimorfni kombinacij je znašal 10,5 %. Povprečno smo na eno kombinacijo dobili 0,11 polimorfni alelov, kar je zelo malo. Blair in sod. (2012) so

z uporabo AFLP pridobili 3,1 polimorfni alelov, kar je v primerjavi z raziskavo, kjer so prav tako uporabili populacijo križancev srednjeameriškega genskega sklada, Muñoz in sod. (2004) (do 8,8), še vedno malo, a podobno raziskavi Cichy in sod. (2009) s populacijo andskega izvora (2,2). Markerji AFLP so bili bolj polimorfni v primeru populacije križanja med genskima skladoma kot znotraj istega genskega sklada (Beebe in sod., 2001).

Od šestih testiranih kombinacij markerjev RAPD smo dobili eno polimorfno. Znale so raziskave populacij znotraj genskega sklada, kjer je polimorfnosti markerjev RAPD slaba (Beebe in sod., 2000; Blair in sod., 2012). Marotti in sod. (2007) so pri analizi genetske raznolikosti 16 genotipov navadnega fižola italijanskega območja v primerjavi s komercialnimi sortami določili 69 % polimorfnost markerjev RAPD, kar pa je manj kot pri ISSR (85 %) in delno specifičnih (90 %) markerjih. Pri zadnjih smo v našem poskusu od 7 testiranih kombinacij dobili 4 polimorfne, kar predstavlja 57% delež polimorfnosti. ISSR so se med vsemi tipi molekulskih markerjev, ki smo jih uporabili v naši analizi, izkazali za najbolj polimorfne, s kar 80 % deležem polimorfnosti.

Markerji RGAP in SRAP so od testiranih 68 in 64 kombinacij doprinesli vsak po 26 polimorfni. Še enkrat večji delež (66 %) polimorfnosti so objavili Mutlu in sod. (2006), ki so degenerativne začetne oligonukleotide naredili iz ohranjene domene kinaza-1a (GVGKTT) in hidrofobne domene (GLPLAL) znanega NBS-LRR (angl. nucleotide binding sites - leucine rich repeats) tipa odpornostnih (R) genov in iz EST podatkovnih baz. Manjši delež polimorfnosti kodominantnih markerjev SRAP (20 %) je bil v raziskavi na zelju (Li in Quiros, 2001). Ceylan in sod. (2014) so pri raziskavi genetske raznolikosti turškega fižola z markerji SRAP pridobili visoko, 64% polimorfnost.

V raziskavah navadnega fižola je bilo razvitih veliko število mikrosatelitnih markerjev, tako iz srednjeameriškega kot tudi iz andskega genskega sklada, in veliko jih je bilo uporabljenih v genskem kartiranju (Blair in sod., 2003, 2011, 2012; Ochoa in sod., 2006; Grisi in sod., 2007; Córdoba in sod., 2010a, b). Od velikega števila testiranih mikrosatelitov (477) je bil delež vseh dobljenih polimorfni kombinacij v naši raziskavi 21,4%, kar je dvakrat toliko kot poročajo Blair in sod. (2011, 2012). Delež polimorfizma je variiral glede na vir oligonukleotidov. Večjo polimorfnost mikrosatelitnih markerjev (22–36,96 %) smo dobili iz virov Métais in sod. (2002), Gaitan-Soils in sod. (2002), Buchimano in sod. (2007), Hanai in sod. (2010), Buso in sod. (2006), Cordoba in sod. (2012) in Grisi in sod. (2007), manj (4–14,63 %) pa iz Blair in sod. (2003, 2008, 2009a, b) ter Chen in sod. (2014).

5.1.1.4 Vpliv suše na izražanje genov, ki kodirajo akvaporine in genov, ki kodirajo proteaze, v listih starševskih linij

Ariani in Gepts sta v letu 2015 pri navadnem fižolu identificirala 41 genov, ki kodirajo akvaporine, a so podatki o njihovem delovanju v sušnem stresu še vedno skopi, kljub nekaterim predhodnim objavam (Aroca in sod., 2006; Montalvo-Hernandez in sod., 2008; Recchia in sod., 2013). Geni, povezani z odzivom rastlin na sušni stres, kamor so vključeni tudi geni AKP, se v različnih genotipih izražajo različno (Recchia in sod., 2013). Z namenom ugotavljati razlike v odzivu na sušni stres med dvema različno tolerantnima

starševskima linijama navadnega fižola, sorte 'Tiber' in 'Starozagorski', smo v raziskavi analizirali stopnjo izražanja štirih genov *AKP*, *PvPIP1;2*, *PvPIP2;7*, *PvTIP4;1* in *PvTIP1;1*. Osredotočili smo se na izražanje genov dveh najpomembnejših in najbolj razširjenih poddružin *AKP*, *PIP* in *TIP*. Od vseh identificiranih genov je izražanje genov, ki jih uvrščamo v ti dve poddružini, v različnih organih navadnega fižola, največje (Ariani in Gepts, 2015). V naši raziskavi smo ugotovili, da je izražanje izbranih genov glede na kontrolo večinoma zmanjšano v različnih stopnjah suše ($VP_{S1} = -0,5 - -1,0$ MPa, $VP_{S2} = -1,5 - -2,0$ MPa, $VP_{S3} < -2,5$ MPa), medtem ko je v rehidraciji enako ali celo višje v primerjavi s kontrolnimi rastlinami. Vodni status rastlin starševskih linij smo določili z njihovim vodnim potencialom ter z vsebnostjo vode v listu in substratu (Priloga IJS 1).

Funkcionalno so *PIP* najpomembnejši akvaporini, saj se nahajajo v plazmalemi in uravnavajo transport vode ob osmotskih premikih vode iz/v protoplast koreninskih in listnih celic. V naši raziskavi smo opazili veliko razliko v izražanju med dvema genoma poddružine *PIP*. Relativna stopnja izražanja gena *PvPIP2;7* je bila pri kontrolnih rastlinah starševskih linij genotipsko specifična. Večjo relativno stopnjo izražanja tega gena smo ugotovili pri sorti 'Tiber'. Pri rastlinah, izpostavljenih suši, se je izražanje gena *PvPIP2;7* močno zmanjšalo pri obeh starševskih linijah. Zmanjšanje izražanja tega gena je manj izrazito, razen v drugi stopnji suše, pri sorti 'Starozagorski' ($VP = -2,67 \pm 0,52$ MPa). Večje zmanjšanje izražanja gena *PvPIP2;7* je lahko posledica funkcije akvaporinov poddružine *PIP2*, ki omogoča večji transport vode skozi celično membrano v primerjavi s poddružino *PIP1*. V nekaterih študijah poročajo o močnejši povezanosti poddružine *PIP1* z asimilacijo CO_2 kot s transportom vode (Heckwolf in sod., 2011; Uehlein in sod., 2012).

Predstavniki *AKP* poddružine *TIP* se nahajajo v tonoplastu in regulirajo transport vode med vakuolo ter citoplazmo, kar uravnava turgor celice (Afzal in sod., 2016). V naši raziskavi je na zmanjšanje izražanja gena *PvTIP1;1* vplivala stopnja suše, genotip ali njuna interakcija, medtem ko je bilo zmanjšanje izražanja gena *PvTIP4;1* odvisno samo od stopnje suše. Zmanjšanje izražanja gena *PvTIP1;1* je lahko posledica velike prepustnosti vode, kot se je to izkazalo pri genu *AtTIP1;1*, pri *Xenopus oocytes* (Vera-Estrella in sod., 2004), saj sta si ta dva gena po filogenetski analizi najbolj sorodna (Ariani in Gepts, 2015).

Kljub razlikam v izražanju genov *AKP* med starševskima linijama, gre na splošno pri obeh za zmanjšanje izražanja genov, ki kodirajo *AKP* poddružin *PIP* in *TIP*, kot smo že omenili. Podobno je bilo ugotovljeno pri navadnem repnjakovcu (Alexandersson in sod., 2005) in jagodnjaku (Šurbanovski in sod., 2013). Poleg tega Alexandersson in sod. (2005) poročajo o zmanjšanem izražanju genov, ki kodirajo *AKP* skupin *PIP1* in *PIP2* v listih navadnega repnjakovca, izpostavljenim sušnemu stresu, a ne po rehidraciji. V naši raziskavi se je relativna stopnja izražanja analiziranih genov med rehidracijo povečala in izenačila z izražanjem pri kontrolnih rastlinah, ali pa je bila celo večja. V obeh starševskih linijah je bilo izražanje *PvPIP2;7* povečano za več kot 8-krat glede na kontrolne rastline, pri sorti 'Tiber' je bilo izražanje *PvTIP1;1* povečano za skoraj 3-krat. Podobno je bila relativna stopnja izražanja genov, ki kodirajo *AKP* skupine *PIP2*, v koreninah navadnega fižola zmanjšana v sušnih pogojih pri obeh različno tolerantnih sortah, medtem ko je bila po rehidraciji pri tolerantni sorti povečana, pri občutljivi pa zmanjšana (Recchia in sod., 2013). Razlog za zmanjšanje izražanja genov za *AKP* pri rastlinah je minimizacija pretoka vode skozi celične membrane in preprečevanje prevelike izgube vode ter vzdrževanje

turgorja lista. Glede na naše rezultate in rezultate predhodnih objav lahko sklepamo, da specifični AKP pomagajo pri uspešnejši prilagoditvi rastlin fižola na sušni stres.

Blum (2015) je ugotovil, da AKP pomembno vplivajo na povečanje prepustnosti za vodo in vnos vode skozi korenine, kar loči anizohidrične rastline od izohidričnih. Anizohidrične rastline na sušni stres reagirajo hitreje, saj z regulacijo abscizinske kisline prej zaprejo listne reže in imajo tako manjšo porabo vode, kar jim omogoča ohranjanje listnega turgorja tudi v času suše. Za razliko od teh izohidrične rastline ne morejo učinkovito ohranjati listnega turgorja med sušnim stresom, kar privede do zgodnejše osmotske prilagoditve in povečanja izrabe vode iz zemlje. Za uvrstitev sorte 'Tiber' in 'Starozagorski' med izohidrične oz. anizohidrične rastline so potrebne dodatne raziskave, zato za sedaj ne moremo z gotovostjo povezati njihovih tovrstnih fizioloških karakteristik z odzivom na sušo na nivoju izražanja genov, ki kodirajo AKP.

Kljub temu da se je izražanje genov *PvPIP1;2*, *PvPIP2;7*, *PvTIP4;1* in *PvTIP1;1* v vseh stopnjah suše pri obeh starševskih linijah zmanjšalo, smo pri posamezni stopnji suše med bolj tolerantno sorto 'Tiber' in manj tolerantno sorto 'Starozagorski' ugotovili značilne razlike v izražanju teh genov, kar smo že omenili. Ti geni, ki kodirajo AKP, so na podlagi naših rezultatov primerni potencialni markerji za selekcijo tolerantnih rastlin navadnega fižola.

Proteaze imajo pomembno vlogo pri odzivu rastlin na različne stresne dejavnike, saj sodelujejo pri različnih presnovnih procesih in razgradnji proteinov (Van der Hoorn, 2008). V listih navadnega fižola se nahaja več serinskih endo- in aminopeptidaz, na katere suša vpliva različno (Budič in sod., 2013, 2016). Pri sorti navadnega fižola 'Zorin', ki je zmerno občutljiva na sušo, so identificirali in okarakterizirali dve novi proteazi, *PvSLP1* in *PvSLP2*, podobni subtilizinu. Proteaza *PvSLP2* je vpletena v odziv na sušo (Budič in sod., 2013). Da bi ugotovili, ali stopnja izražanja teh dveh proteaz korelira z različno močno toleranco na sušni stres, smo analizirali relativno stopnjo izražanja genov *PvSLP1* in *PvSLP2* pri bolj tolerantni sorti 'Tiber' in manj tolerantni sorti 'Starozagorski'.

Z analizo izražanja obeh serinskih proteaz smo pokazali različno stopnjo izražanja med kontrolnimi rastlinami navadnega fižola in rastlinami v suši. Gen *PvSLP1* je bil v navadnem fižolu identificiran z uporabo začetnih oligonukleotidov za domnevne serinske endopeptidaze arašida (*Arachis hypogaea*) (AHSP) (Budič in sod., 2013), o kateri Dramé in sod. (2007) poročajo, da se je stopnja izražanja med sušnim stresom spremenila. Aminokislinska sestava proteaze *PvSLP1* je s 85 % najbolj podobna AHSP, zato je bil različen odziv te proteaze na sušo, v primerjavi s kontrolo, pričakovan. V naši raziskavi se je relativna stopnja izražanja gena *PvSLP1* v sorti 'Tiber' v začetni suši (VP = -0,15 MPa) močno povečala v primerjavi z njegovo kontrolo, v močnejši suši (VP = -0,25 MPa) pa se je zmanjšala za več kot polovico relativne stopnje izražanja tega gena pri kontrolnih rastlinah sorte 'Tiber'. Relativna stopnja izražanja gena *PvSLP1* je pri vzorcih sorte 'Starozagorski' večja že v kontrolnih rastlinah, s stopnjevanjem suše pa se je izražanje postopno zmanjševalo in v močni suši doseglo manj kot četrtno stopnje izražanja tega gena pri kontrolnih rastlinah sorte 'Tiber'. Za razliko od izražanja gena *PvSLP1* se je izražanje *PvSLP2* pri obeh starševskih linijah s stopnjevanjem suše izrazito povečalo v primerjavi z izražanjem tega gena pri kontrolnih rastlinah sorte 'Tiber'. Podobno izražanju

gena *PvSLP2* v naši raziskavi, se je izražanje genov aspartatne proteaze pri sortah navadnega fižola, 'Carioca' in 'IPA', povečalo, v primerjavi z dvema sortama *Vigna unguiculata* L. Walp, kjer je bilo izražanje konstitutivno (Cruz de Carvalho in sod., 2001). Pri navadnem fižolu sorte 'Zorin' niso ugotovili vpliva suše na izražanje gena *PvSLP2*, čeprav se je aktivnost tega gena v suši povečala (Budič in sod., 2013).

Z našo raziskavo smo dokazali tudi genotipsko specifično izražanje genov obeh domnevno serinskih endopeptidaz. Kljub temu, da je bil trend izražanja obeh genov pri sorti 'Tiber' in sorti 'Starozagorski' podoben (zmanjšanje izražanja gena *PvSLP1* in povečanje izražanja gena *PvSLP2* pri rastlinah v sušnem stresu v primerjavi s kontrolnimi rastlinami), je bila relativna stopnja izražanja statistično značilno različna med starševskima linijama v vseh treh stopnjah suše. Relativna stopnja izražanja gena *PvSLP1* se je pri sorti 'Starozagorski' postopno in enakomerno zmanjševala s povečevanjem stopnje suše v primerjavi s sorto 'Tiber'. Podobno so v študiji izražanja genov domnevne serinske proteaze, pri odzivu rastlin na sušni stres, poročali o zmanjšanju stopnje izražanja pri dveh različno tolerantnih sortah arašida, le da je bilo zmanjšanje izražanja izrazitejše pri tolerantnejši sorti (Dramé in sod., 2007). Zmanjšanje stopnje izražanja genov, ki kodirajo domnevno serinsko in cisteinsko proteazo arašida v sušnem stresu, je označeno kot mehanizem tolerance rastlin na sušni stres za zmanjšanje aktivnosti teh proteaz in za zamaknitev s sušo inducirane senescence (Dramé in sod., 2007). Močan odziv na sušo je pri sorti 'Tiber' v 10. dnevu suše, kjer je relativna stopnja izražanja dvakrat večja ($VP = -0,15$ MPa) od stopnje izražanja gena *PvSLP1* pri sorti 'Starozagorski' ($VP = -0,15$ MPa). Tudi 24. in 38. dan suše se izražanje gena *PvSLP1* pri rastlinah, izpostavljenih suši, razlikuje med različno tolerantnima starševskima linijama. Relativna stopnja izražanja gena *PvSLP2* je bila pri sorti 'Tiber' v vseh treh stopnjah suše manjša v primerjavi s stopnjo izražanja tega gena pri rastlinah sorte 'Starozagorski'. Po 24. dnevu suše se relativna stopnja izražanja *PvSLP2* gena pri sorti 'Tiber' ($VP = -0,25$ MPa) ni več spreminjala, pri sorti 'Starozagorski' ($VP = -0,33$ MPa) pa se je še naprej povečevala.

Nadaljnje raziskave korelacije med različno tolerantnimi sortami navadnega fižola na sušni stres in razlikami v izražanju genov, ki kodirajo proteazi *PvSLP1* in *PvSLP2*, lahko služijo kot pomembne informacije o vlogi/-ah teh subtilaz pri odzivu navadnega fižola na sušni stres. Z analizo izražanja genov *PvSLP1* in *PvSLP2* smo ugotovili različno izražanje teh dveh genov pri dveh različno tolerantnih sortah navadnega fižola na sušni stres, kar je pomemben doprinos k nadaljnjim analizam določanja potencialnih biokemijskih markerjev, s katerimi bi lahko določili QTL, povezane z odzivom na sušni stres pri navadnem fižolu in ostalih sorodnih rastlinah.

5.1.2 Kartiranje molekulskih markerjev

Z uporabo mikrosatelitnih, AFLP in morfoloških markerjev smo konstruirali celotno gensko karto dolžine 486,27 cM, ki je za dobro polovico krajša kot predhodno objavljena genska karta (Blair in sod., 2003, 2012; Checa in Blair, 2008; Ochoa in sod. 2006; Cichy in sod., 2009). Krajšo vezano karto 1000 cM so objavili Blair in sod. (2011) ter Yuste-Lisbona in sod. (2014), oboji s populacijo znotraj andskega genskega sklada, ter Blair in

sod. (2006b) z genotipoma različnih genskih skladov. Krajšo gensko karto povzroči nizka frekvenca rekombinacij. Temu bi se lahko izognili s še številnejšo populacijo.

Omenjene markerje smo s pomočjo računalniškega programa JoinMap 4.0 in podatkov predhodno objavljenih raziskav razporedili v 10 vezanih skupin (LG). Dve vezani skupini (LGx1, LGx2) vsebujeta markerje, ki po literaturi večinoma niso bili razporejeni v nobeno od 11 skupin navadnega fižola. Pridobljeno razporejenost markerjev smo primerjali tudi s skupno gensko karto Galeano-Fernandez_2011 (Galeano in sod., 2011) (Priloga R). Dolžina skupne genske karte znaša 2041 cM in je 3-krat daljša od naše, povprečna razdalja med markerji pa je 2 cM, pri nas 4,8 cM.

V naši genski karti so v LGx1 markerji razporejeni v dve skupini na vsakem koncu vezane skupine. V prvi skupini sta dva markerja AFLP locirana na istem mestu in pet mikrosatelitov oddaljenih od AFLP samo za 1cM. Druga skupina s tremi mikrosateliti je od prve oddaljena 24 cM in vsebuje dva mikrosatelita, ki sta po skupni genski karti Galeano-Fernandez_2011, razporejena v vezano skupino 11. Vezana skupina LGx2 vsebuje vse tri kartirane morfološke markerje, ki z ostalimi molekulskimi markerji niso dovolj povezani, da bi tvorili skupno vezano skupino, zato smo jih umestili v svojo. O kartiranju kvalitativnih morfoloških znakov ni veliko znanega. Yuste-Lisbona in sod. (2014) so morfološki znak, pigmentacija semena (*P* lokus), umestili v vezano skupino Pv7, blizu markerja BM185. Prav tako so blizu tega markerja, na b07 vezani skupini, Blair in sod. (2006b) umestili marker za beljakovino fazeolin.

V primerjavi z drugimi objavljenimi kartami in skupno gensko karto Galeano-Fernandez_2011 noben polimorfen marker pri nas ni bil razporejen v skupine 3, 7 in 11. Kljub temu, da smo z namenom čim večje pokritosti in razporejenosti markerjev po celotnem genomu navadnega fižola, testirali tudi markerje, ki so bili po predhodnih raziskavah uvrščeni v te tri skupine, z začetnimi oligonukleotidi markerjev nismo dobili uspešnega produkta z analizo PCR ali pa marker med starševskima linijama ni bil polimorfen.

Končno število razporejenih markerjev je bilo 105, od tega 79 mikrosatelitov, 23 markerjev AFLP in 3 morfološki markerji (barva semena, cveta in stebila). Markerji so bili v vezanih skupinah večinoma enakomerno razporejeni (10–12 markerjev), le v LG1, LG4 in LGx2 je bilo markerjev manj (6, 5 in 3), v LG2, LG5, in LG10 pa več (17, 15 in 16). Med posameznimi markerji le LG1 in LGx2 nista vsebovali markerjev AFLP. V ostalih LG je bila razporejenost enakomernejša (8,7–17,4 %), izstopali sta skupini LG4 z najmanjšo (4,3 %) in LG9 z največjo zastopanostjo (21,7 %) markerjev AFLP. Mikrosateliti so bili po vezanih skupinah razvrščeni različno, saj jih je bilo v devetih vezanih skupinah od 4 (LG4) do 14 (LG10). Predhodne študije prav tako poročajo o večji zastopanosti mikrosatelitov predvsem na LG2, nekatere skupine, zlasti LG3 pa so bile z markerji težko zapolnjene (Blair in sod., 2003, 2008, 2011, 2012). V skupni genski karti Galeano-Fernandez (2011) je v vsaki vezani skupini povprečno 91 markerjev (od 151 na Pv02 do 67 na Pv09). Verjetno sta za večino vezanih skupin na genski karti predstavljeni obe kromatidi, za LG9 in LG11 pa je lahko kartirana samo ena od kromatid, čeprav je lokacija centromer obeh skupin za navadni fižol znana, saj je določena z različnimi molekulskimi markerji (Blair in sod., 2012).

Naša genska karta je prva karta narejena s populacijo navadnega fižola, ki je prilagojena na srednje-evropske razmere. Karta je pomemben doprinos raziskavam tudi zato, ker temelji na populaciji križancev dveh starševskih linij, ki izhajata iz istega, andskega genskega sklada (Maras, 2007). Pomembno se je zavedati, da je pomanjkanje polimorfizma velik problem take populacije zaradi križanja znotraj genskega sklada in bližnje sorodstvene vezi, kjer so lahko možnosti o enakih delih genoma med starši in potomci večje. Razdalje, ki so daljše od 15 cM, in prazne LG, bomo v prihodnosti zapolnili z novimi markerji. Za učinkovito in gosto pokrito vezano karto je za gensko analizo potrebna večja populacija RIL, kar predstavlja tudi svojevrsten izziv. Kvantitativne lastnosti, kot sta število dni do cvetenja in masa 100 semen, so se tudi v naši raziskavi izkazale za parametre, ki se odzivajo na sušni stres. Prav tako smo s fiziološkimi parametri določili potencialne QTL, ki kažejo na različen odziv različno tolerantnih sort na sušni stres. Med dobljenimi QTL obstaja korelacija, saj je polnjenje/večanje semen odraz delovanja fotosinteznega aparata in mobilizacije fotosinteznih produktov.

5.1.3 Kartiranje lokusov kvantitativnih lastnosti

Sušni stres v rastlini sproži različne odzive. S spremljanjem čim večjega števila lastnosti na različnih ravneh lahko pridobimo širši pogled in boljše razumevanje delovanja rastline v odgovoru na stresni dejavnik. Dobljena karta vezanih skupin nam je omogočila identifikacijo QTL z analizo desetih različnih kvantitativno dedovanih lastnosti, ki smo jih v dveh poskusih pridobili pri rastlinah navadnega fižola v suši in pri kontrolnih rastlinah. Določili smo 18 QTL na petih od desetih vezanih skupinah, in sicer na LG1, LG2, LG5, LG6 in LG9. Lastnosti, s katerimi so povezani QTL, vključujejo fenologijo rastline, parametre pridelka in lastnosti, ki so povezane z delovanjem fotosinteznega aparata.

Mesta dobljenih QTL smo primerjali z že znanimi QTL, predvsem smo se osredotočili na tiste, ki so kartirani na skupni genski karti Galeano-Fernandez (2011). Na skupni genski karti so kartirani QTL za različne lastnosti, kot so: začetek in konec cvetenja, polna zrelost, zrelost strokov za stročje in za semena, vsebnost fosforja v rastlini, vsebnost tanina v plašču semen, gostota, teža in dolžina korenin, dolžina, širina, višina in masa semen, pridelek, idr.

Za lastnost število dni do cvetenja smo QTL določili samo s poskusom na BF, in sicer na dveh vezanih skupinah. Na LG1 smo zelo blizu določili tudi vse tri parametre pridelka skupaj s QTL za število dni do strokov. QTL za pridelek smo določili samo v poskusu BF, kar je lahko posledica močnejše suše in odpadanja cvetov zaradi visokih temperatur in s tem slabšega pridelka, kot smo že omenili. Skupaj smo jih določili tudi na LG9, št. strokov na rastlino pa tudi na LG5. Število dni do strokov smo povezali s QTL na skoraj vseh petih LG, kjer smo določili QTL, razen na LG2. Za to lastnost, kot tudi za št. semen na strok, smo na LG9 določili po dva QTL.

Tudi v drugih predhodnih raziskavah navadnega fižola so odkrili QTL, ki kontrolirajo različne lastnosti, na enakih vezanih skupinah (Tar'an in sod., 2002; Beattie in sod., 2003; Blair in sod., 2006; Perez-Vega in sod., 2010). Perez-Vega in sod. (2010) poročajo o treh

kromosomskih regijah, kjer so skupaj določili QTL iste skupine lastnosti, fenološke lastnosti in lastnosti velikosti semena, ter o petih regijah, kjer so skupaj določili QTL za različne lastnosti. Združevanje QTL regij je lahko posledica prisotnosti različnih tesno povezanih genov ali zaradi pleiotopičnega efekta enojnega genetskega elementa (Aastveit A. H. in Aastveit K., 1993). Pleiotropski efekt lahko razloži prisotnost združevanja QTL regij podobne oz. iste skupine lastnosti (Perez-Vega in sod., 2010).

Za razliko od omenjenih lastnosti, smo za fiziološke parametre določili QTL regije v obeh poskusih. Za lastnost vodni potencial v suši 2 smo QTL določili tako pri BF kot tudi pri KIS, a ne na isti LG. QTL regijo za vodni potencial iz poskusa BF smo določili na LG2, vezanega z mikrosatelitnim markerjem BM172, QTL regijo za vodni potencial iz poskusa KIS pa smo določili na LG5, in sicer vezanega na mikrosatelitni marker BMb318. En QTL smo določili še za vodni potencial v kontrolnih rastlinah iz poskusa KIS, enega smo povezali s hitrostjo transporta elektronov v suši 1 iz poskusa BF.

Podobno kot pri Blairu in sod. (2012) je imela med vsemi lastnostmi največjo vrednost R^2 masa 100 semen, kar lahko pomeni, da je masa semen zelo dedna lastnost, tudi pod stresnimi, sušnimi pogoji (Schneider in sod., 1997a, b). Suša zavira polnjenje semen, zato lahko semena z večjo maso kažejo na večjo toleranco na sušo in s tem omogočajo večji pridelek (Ramírez-Vallejo in Kelly, 1998).

QTL, povezani z lastnostmi DC-BF, DStr-BF, StrR-BF in M100Se-MB, ki smo jih določili na LG1, so določili že v predhodnih raziskavah. Perez-Vega in sod. (2010) so blizu markerja *Fin* določili QTL za št. dni do konca cvetenja, kar je podobno kot lastnost št. dni do strokov, ki smo jo spremljali v naši raziskavi. Poleg te lastnosti so v omenjeni vezani skupini določili tudi QTL za število dni do cvetenja in št. dni do zrelosti. Blair in sod. (2006) so poleg št. dni do cvetenja na LG1 določili tudi QTL za št. strokov na rastlino. Blair in sod. (2012) na LG1 niso določili QTL.

Na LG2 smo v naši raziskavi kartirali QTL za lastnost DC-BF, ki je vezan na mikrosatelitni marker PvM100. Markerja PvM100 na skupni genski karti Galeano-Fernandez (2011) ni, lahko pa na podlagi sosednjih markerjev GATS91 in BM142 sklepamo na njegovo lokacijo. Na tej lokaciji so Perez-Vega in sod. (2010) prav tako kartirali QTL za št. dni do cvetenja. Na drugem koncu kromosoma smo določili QTL, povezan s fiziološko lastnostjo, na katero vpliva suša, in sicer lastnostjo za vodni potencial v suši 2 v poskusu BF, ki je še niso določili v predhodnih raziskavah. V tovrstnih raziskavah v tem delu kromosoma tudi niso določili QTL, povezanega z nobeno drugo lastnostjo, blizu pa so bile kartirane lastnosti korenin v povezavi z dostopnostjo fosforja (Ochoa in sod., 2006). Asfaw in sod. (2012), ki so raziskovali lastnosti korenin v povezavi s sušo pri navadnem fižolu, na tej vezani skupini niso določili QTL.

Pet QTL smo določili na LG5. En QTL je povezan s fenološko lastnostjo, en z vrednotenjem pridelka in trije s fiziološkim parametrom, povezanim z odzivom rastline na sušni stres. QTL, povezan s številom strokov na rastlino, je bil pridobljen s podatki iz poskusa BF, ostale štiri QTL, št. dni do strokov in vodni potencial v kontroli, ki ima dva vrhova, ter VP-S2, temeljijo na podatkih iz poskusa KIS. QTL za VP-K-KIS in DStr-KIS

sta najbližje vezana na marker AFLP. Na podobnih lokacijah so Blair in sod. (2012) določili QTL regije za začetek cvetenja, zrelost in maso semen.

Na LG6 smo določili dva QTL, vsakega na eni strani vezane skupine. Povezani sta z lastnostmi DStr-KIS in ETR-S1-BF, ki je nov, še nekartiran QTL, povezan z odzivom rastline na sušo. Glede na skupno gensko karto Galeano-Fernandez (2011) je največ QTL na LG6. Prav tako, kot je pri nas lastnost DStr-KIS blizu markerja BMc238, je pri Blairu in sod. (2012) QTL za št. dni do zrelosti. QTL za hitrost transporta elektronov v suši 1 na BF je najbližje skupini treh AFLP in dveh mikrosatelitov, ki so locirani na isti regiji kromosoma. Najbližje lastnosti ETR je marker BMb182, ki je poleg SSR-IAC47, ki ga na karti Galeano-Fernandez (2011) ni, povezan tudi s QTL za lastnosti semena (Perez-Vega in sod., 2010), pridelek (Blair in sod., 2006, 2012) ter začetek in konec zrelosti strokov (Perez-Vega in sod., 2010; Blair in sod., 2012).

Zadnja vezana skupina, kjer smo določili QTL, je LG9. Tu smo določili pet QTL na dveh mestih te vezane skupine. Po en vrh lastnosti DStr-BF in SeStr-BF je lociran blizu mikrosatelitnega markerja BM141, ki so ga Blair in sod. (2006) povezali z začetkom cvetenja in pridelkom zrnja. Ostale tri QTL, drugi par lastnosti DStr-BF in SeStr-BF ter M100Se-BF, so na naši karti najbližje markerjem AFLP.

Genske karte, objavljene v različnih publikacijah, se razlikujejo po izboru starševskih genotipov in številu ter tipu molekulskih markerjev, kar onemogoča prileganje teh genskih kart med seboj. Mnogokrat se v teh primerih pridobljeno število in relativna pozicija QTL, ki so vključeni v določeno lastnost, povezano z odzivom rastline, razlikujejo (Perez-Vega in sod., 2010). Podobno se je število in pozicija QTL za število dni do zrelosti razlikovala med Koinange in sod. (1996), ki je določil tri QTL, dva na vezano skupino B1 in eno na B8, medtem ko so Tar'en in sod. (2002) določil dva QTL na vezanih skupinah B9 in B10. Beattie in sod. (2003) so določili tri QTL za št. dni do zrelosti na vezanih skupinah B4, B6 in B8, Blair in sod. (2006) pa dva QTL na B5 in B7. Rezultati kažejo, da je pri teh razlikah zelo velik vpliv izbire populacije kartiranja.

Pridobljeni QTL bodo pomembni potencialni markerji, uporabni pri strategijah žlahtnjenja navadnega fižola in tudi drugih bližnjih sorodnikov, za večjo toleranco na sušni stres, ko bodo potrjeni z linijami, ki so prav tako prilagojene na naše okolje.

5.2 SKLEPI

Z zbranimi rezultati raziskave smo potrdili zastavljene hipoteze in prišli do naslednjih sklepov:

- s spremljanjem in merjenjem morfoloških in fizioloških parametrov ter z analizami odziva proteaz smo določili lastnosti, ki so se razlikovale v sušnem stresu med rastlinami starševskih linij ('Tiber', 'Starozagorski črn');
- s karakterizacijo izbranih starševskih linij navadnega fižola in njunih 82 potomcev (RIL) F₈-generacije, podvrženih sušnemu stresu, smo pridobili podatke o segregirajočih fenoloških (št. dni do cvetenja, št. dni do strokov) in fizioloških (vodni potencial, potencialna fotokemična učinkovitost, hitrost transporta elektronov) znakov ter podatke o količini pridelka, ki so bili podlaga za analizo QTL;
- s karakterizacijo izbranih starševskih linij in njunih 82 potomcev (RIL) smo z mikrosatelitnimi in molekulskimi markerji AFLP pridobili zadostno število polimorfizmov, na osnovi katerih smo izdelali vezano gensko karto navadnega fižola;
- z analizo QTL smo določili mesta 10 kvantitativnih lastnosti, od katerih sta dve (vodni potencial, hitrost transporta elektronov) udeleženi v odziv fižola na sušni stres in do sedaj še nista bili kartirani;
- z analizo izražanja genov, ki kodirajo akvaporine in genov, ki kodirajo proteaze, smo ugotovili razlike v izražanju teh genov med kontrolnimi rastlinami in rastlinami izpostavljenimi različni stopnji sušnega stresa. Prav tako smo ugotovili razlike v izražanju teh genov med starševskima linijama navadnega fižola, različno tolerantnima na sušni stres.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Med vsemi zrnatimi stročnicami je v svetovnem merilu navadni fižol (*Phaseolus vulgaris* L.) najpomembnejši za prehrano ljudi (CGIAR, 2016). Poleg sorazmerno velike vsebnosti proteinov, ki vsebujejo esencialne aminokisline, vsebnosti vitaminov in mineralov, ima navadni fižol tudi veliko energijsko vrednost. Šestdeset odstotkov pridelovalnih površin navadnega fižola je v regijah, kjer primanjkuje vode. Suša v svetovnem merilu vsako leto povzroči od 60 do 80 % manjši pridelek, tudi slabše kakovosti (Rao, 2001; Beebe in sod., 2011). Zaradi globalnih klimatskih sprememb se bo pogostost ekstremnih vremenskih dogodkov povečala (Kajfež-Bogataj, 2012), na kar se bo treba prilagoditi tudi z razvojem tolerantnejših sort, prilagojenih na lokalne klimatske razmere. Toleranca na sušo je zapletena poligenska lastnost, saj je povezana z različnimi morfološko-anatomskimi prilagoditvami in fiziološkimi oz. presnovnimi mehanizmi rastline. Znana mesta kvantitativnih lastnosti, povezanih z odzivom rastline na sušni stres, v genomu navadnega fižola bodo pomagala v procesu zlahtnjenja k natančnejši selekciji tolerantnih sort navadnega fižola.

V naši raziskavi smo z namenom kartirati kvantitativne lokuse, povezane s sušnim stresom, izbrali za vzgojo populacije kartiranja starševski liniji navadnega fižola, ki sta pokazali v predhodnih raziskavah različno toleranco na sušo: tolerantnejšo sorto 'Tiber' in manj tolerantno sorto 'Starozagorski črn' ('Starozagorski'). 82 rekombinantnih inbridiranih linij (RIL) navadnega fižola F₈-generacije je bilo pridobljenih v prejšnjih študijah s križanjem starševskih linij in metodo potomstva posameznega semena.

Z namenom karakterizirati starševske linije in ugotoviti razlike v odzivu rastlin na sušni stres, smo v poskusih v rastni komori in rastlinjaku, v kontroliranih razmerah, ovrednotili fenološke, morfološke in fiziološke lastnosti ter količino pridelka, izvedli analizo polimorfnosti molekulskih markerjev in analizo izražanja izbranih genov, ki kodirajo akvaporine ter genov, ki kodirajo proteaze pri rastlinah sort 'Tiber' in 'Starozagorski'. Meritve in vzorčenja smo opravili dan pred sušo, v treh stopnjah suše, pri različnih intervalih vodnega potenciala v rastlini in po rehidraciji. Rezultati so pokazali, da se sorti 'Tiber' in 'Starozagorski' razlikujeta v petih morfoloških lastnostih; barvi jadra, barvi stebela, barvi semena, tipu rasti in barvi svežega stroka. Značilnih razlik v številu dni do cvetenja in v številu dni do pojava strokov ter v količini pridelka med starševskima linijama ni bilo. Ugotovili smo značilne razlike v fizioloških parametrih. Večjo sposobnost zadrževanja vode v listih je imela sorta 'Tiber', saj se je razlika med kontrolnimi rastlinami in rastlinami v suši v relativni vsebnosti vode v listih (RVV), kot tudi pri vodnem potencialu (VP), pokazala šele sedmi dan suše, medtem ko pri sorti 'Starozagorski' že četrti dan. Hitrejši odziv rastlin na sušo se je pokazal pri meritvah VP, saj so rezultati pokazali značilne razlike med starševskima linijama že v četrtem dnevu (VP sorte 'Tiber' je $-0,46 \pm 0,06$ MPa, VP sorte 'Starozagorski' $-0,77 \pm 0,07$ MPa). Sedmi dan so se značilne razlike pokazale med starševskima linijama tudi v RVV (VP sorte 'Tiber' je $-0,93 \pm 0,18$ MPa, VP sorte 'Starozagorski' $-1,62 \pm 0,17$ MPa). Enajsti dan značilnih razlik med starševskima linijama ni bilo (VP sorte 'Tiber' je $-2,80 \pm 0,2$ MPa, VP sorte 'Starozagorski' $-3,00 \pm 0,00$ MPa). Rehidrirane rastline so 11. dan (štiri dni po rehidraciji)

dosegle vrednosti RVV in VP kontrolnih rastlin (VP sorte 'Tiber' je $-0,17 \pm 0,04$ MPa, VP sorte 'Starozagorski' je $-0,40 \pm 0,00$ MPa). Izkazalo se je, da vsebnost vode v substratu pod 24 vol% močno vpliva na vsebnost vode v rastlinah in s tem na močan odziv rastlin na sušni stres. Stopnja suše je močno vplivala tudi na netofotosintezo (A_N), prevodnost listnih rež (g_s), potencialno fotokemično učinkovitost (F_v'/F_m') in transpiracijo (Tr). Rezultati teh parametrov so pokazali močan odziv rastlin na sušni stres, s hitrim zapiranjem listnih rež, kar je preprečilo prehajanje vode iz rastline in povzročilo zmanjšanje transpiracije. Z zapiranjem listnih rež se je manjšala tudi količina dostopnega CO_2 in s tem netofotosinteza. Rastline sorte 'Tiber' so se na podlagi merjenih fizioloških parametrov izkazale za tolerantnejše na sušo v primerjavi s sorto 'Starozagorski', saj so bile sposobne ob enaki VVS obdržati višji RVV in višji VP.

Da bi pridobili čim več polimorfni molekulskih markerjev, smo starševski liniji ovrednotili z uporabo različnih tipov markerjev, in sicer SRAP, RGAP, RAPD, ISSR, delno specifični markerji, AFLP in mikrosateliti. Za najbolj polimorfne markerje so se v naši raziskavi pokazali markerji ISSR, saj je znašal njihov delež polimorfni kombinacij 80 %. Najmanj polimorfni so se izkazali markerji AFLP z 10,5 % deležem polimorfnosti. Mikrosateliti so najpogostejše uporabljeni molekulski markerji pri karakterizaciji in ugotavljanju raznolikosti genotipov navadnega fižola, kar nam je omogočalo testiranje široke palete začetnih oligonukleotidov, ki nam je omogočala razporeditev markerjev po celotnem genomu navadnega fižola.

Z analizo izražanja genov za akvaporine (AKP), *PvPIP1;2*, *PvPIP2;7*, *PvTIP4;1* in *PvTIP1;1* ter proteaze, *PvSLP1* in *PvSLP2*, smo ugotovili razlike v izražanju med rastlinami v različnih stopnjah suše in kontrolnimi rastlinami. Prav tako so razlike v izražanju teh genov med starševskima linijama. Relativna stopnja izražanja vseh štirih izbranih genov, dveh najpomembnejših in najbolj razširjenih poddružin AKP, PIP in TIP, je glede na kontrolo večinoma zmanjšana v vseh treh stopnjah suše, medtem ko je v rehidraciji enaka ali celo višja v primerjavi z izražanjem teh genov pri kontrolnih rastlinah. Prav tako so razlike v relativni stopnji izražanja genov, ki kodirajo subtilizinu podobne proteaze 1 in 2, med rastlinami v suši in kontrolnimi rastlinami. Stopnja izražanja gena *PvSLP1* se je pri rastlinah, izpostavljenih suši, zmanjšala v primerjavi s stopnjo izražanja pri kontrolnih rastlinah, razen v prvi stopnji suše (VP = $-0,15$ MPa) pri rastlinah sorte 'Tiber', kjer se je povečala. Stopnja izražanja gena *PvSLP1* pa se je pri obeh starševskih linijah povečala v primerjavi s stopnjo izražanja tega gena pri kontrolnih rastlinah. Kljub temu smo na nivoju izražanja analiziranih genov ugotovili značilne razlike v odzivu na sušo med starševskima linijama.

Potomce križanja sorte 'Tiber' in 'Starozagorski', 82 rekombinantnih inbridiranih linij (RIL) F_8 -generacije, smo prav tako v treh stopnjah suše okarakterizirali s parametri, v katerih se razlikujeta starševski liniji. Rastline RIL smo testirali s 124 polimorfnimi molekulskimi markerji. Z analizo vezanosti markerjev smo nato z 79 mikrosateliti, 23 AFLP in 3 morfološkimi markerji naredili 486,27 cM dolgo gensko karto navadnega fižola. Markerji so razporejeni v 10 vezanih skupin (LG). Z enakomerno razporejenostjo molekulskih markerjev smo pridobili dobro pokritost genoma navadnega fižola, ki nam je služila kot podlaga za kartiranje kvantitativnih lastnosti (QTL). V analizo QTL smo vključili podatke 28 kvantitativnih lastnosti in določili 18 QTL na petih vezanih skupinah

(LG1, LG2, LG5, LG6, LG9). Z našo raziskavo smo potrdili QTL, ki so povezani z lastnostmi: št. dni do cvetenja, št. dni do pojava strokov, št. semen na strok, št. strokov na rastlino in maso 100 semen. Velik doprinos raziskave pa so potencialni QTL, povezani z vodnim potencialom in hitrostjo transporta elektronov, ki do sedaj še niso bili kartirani in so pomembni parametri odziva rastlin na sušni stres.

Z našo raziskavo smo pridobili QTL, ki bodo pomemben doprinos k žlahtnjenju novih sort navadnega fižola in drugih sorodnih rastlin, tolerantnih na sušni stres. Rezultati analize izražanja genov za AKP in proteaze so pomembna podlaga za nadaljnje analize in identifikacijo potencialnih biokemijskih markerjev, s katerimi bi lahko pridobili dodatne QTL, povezane z odzivom rastlin na sušo.

6.2 SUMMARY

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is considered to be world's most important legume for the human diet (CGIAR, 2016). In addition to its high energy value and content of essential amino acids, vitamins and minerals, especially iron, common bean is considered to be a main source of proteins and is a critical component for fight against malnutrition of thousands of small farmers in Central and South America and South-West Africa as (FAOSTAT, 2014). A huge problem for common bean production is a large proportion of crop growing in regions with low rainfall. Drought causes up to 60% lower yields and reduces the quality of crop (Beebe et al., 2011; White and Singh, 1991). Due to the global climatic changes the frequency of extreme weather events are increasing (Kajfež Bogataj, 2012). Breeding for tolerance to different biotic and abiotic factors has resulted in development of many varieties adapted to local climatic conditions, which are grown in Europe (Šuštar-Vozlič et al., 2012). Since tolerance to biotic and abiotic factors is a complex, polygenic trait associated with the response of plants on different levels, the understanding of the mechanisms of plant response on morphological, physiological and biochemical level is crucial. Relationships between quantitative and genetic traits allow us to identify quantitative trait loci that will be of a great contribution to the breeding programs for a more efficient selection of common bean varieties for improved tolerance to drought.

In our study, we have used a QTL mapping population, developed from two parental lines of common bean, which expressed different tolerance to drought stress, more tolerant 'Tiber' and less tolerant 'Starozagorski čern' ('Starozagorski'). By crossing the parental lines and using a method of single seed descent, F8 generation of 82 recombinant inbred lines (RILs) were obtained.

To characterize the parental lines and to determine the differences between them in response to drought stress at different stages of drought, we set experiments under controlled conditions in a growth chamber and in a greenhouse. Firstly, we have evaluated parent genotypes 'Tiber' and 'Starozagorski' for their yield potential and measured phenological, morphological and physiological characteristics. In addition, we have collected leaf samples for the genetic markers analysis and levels of expression for protease and aquaporin genes. Measurements were carried out at three time points of drought and at rehydration.

The results showed that 'Tiber' and 'Starozagorski' differ in some basic morphological characteristics. No significant differences in number of days to flowering and days to pods as well as in yield between the parental lines were determined. Nevertheless, significant differences in physiological parameters were determined. 'Tiber' had a greater ability to retain water in the leaves, what is evident from results shown for relative water content in leaves (VVR) as well as in water potential (VP) at seventh's day of drought, while for 'Starozagorski' on day 4. On day 7, the VVR showed significant differences between the parental lines. Faster response of plants to drought was demonstrated in results of VP, since results showed significant differences between the parental lines already on day 4. We found no significant differences between the parental lines on day 11. On the eleventh day, four days after rehydration, rehydrated plants reached control value for VVR and VP.

It has been shown that the substrate water content below 24 vol% has a strong influence on the water content in plants due to a stronger response of plants to drought stress.

We did not find any significant interactions between treatments and days of drought among all measured photosynthetic parameters, however we detected the impact of treatment and variance for all parameters except for transpiration. Results of photosynthetic parameters showed a strong response of plants to drought stress by rapid leaf stomata closure, causing reduced transpiration and CO₂ assimilation on the cost of net-photosynthesis reduction. Similar to the results of the water potential, the results of photosynthetic parameters showed poor tolerance to drought stress of 'Starozagorski' compared to 'Tiber'.

In order to gain as many polymorphic molecular markers as we can, we have evaluated the parental lines using a variety of molecular markers, namely SRAP, RGAP, RAPD, ISSR, semi-random, AFLP and microsatellites. The most polymorphic markers in our study were ISSR markers, as the proportion of polymorphic combinations was 80%. The least polymorphic were AFLP markers with a 10,5% share of polymorphism. For the study we have used microsatellite markers, that are the most commonly used molecular markers for the characterization and identification of diversity of common bean genotypes, which allowed us to test a wide range of primers, allowing distribution of markers across the entire common bean genome.

To characterize the parental lines on transcriptome level, we have evaluated the differences in the expression level of protease and aquaporin (AQP) genes. Expression of both isoforms of PIP and TIP genes, the two most important and most widely used subfamilies of the MIP family, was reduced in all three stages of drought compared to control samples, while expression levels in rehydrated plants were almost equal to their controls. Analysis of two subtilases has also revealed differences in expression level between stressed and control plants. Expression level of PvSLP1 decreased during drought, while expression level of PvSLP1 increased. Despite a similar expression pattern, we detected significant differences between more and less drought tolerant parental lines at the transcription level.

For the characterization of RILs, we have used traits, in which 'Tiber' and 'Starozagorski' differ. For the construction of common bean genetic map we used results based on RIL evaluations. We have arranged polymorphic markers into 10 linkage groups. With well-distributed molecular markers, we obtained good coverage of the common bean genetic map, which was used as the basis for mapping of quantitative trait loci (QTL). The QTL analysis determined 18 loci of quantitative traits linked to molecular markers in five linkage groups.

Our study confirmed previously determined QTLs locations, linked to the phenotype and yield traits. We have mapped new QTLs for photosynthetic parameters which are important indicators for plant response to drought stress. Results of our research could serve as an improved tool for common bean breeding programs to improve tolerance to drought and to foster more efficient selection of varieties for constantly changing environment.

7 VIRI

- Aastveit A. H., Aastveit K. 1993. Effects of genotype-environment interactions on genetic correlations. *Theoretical and Applied Genetics*, 86, 8: 1007–1013
- Acosta-Díaz E., Acosta-Gallegos A. J., Trejo-López C., Padilla-Ramírez S. J., Amador-Ramírez D. M. 2009. Adaptation traits in dry bean cultivars grown under drought stress. *Agricultura Técnica en México*, 35, 4: 416–425
- Acosta-Gallegos J. A., Kelly J. D., Gepts P. 2007. Prebreeding in common bean and use of genetic diversity from wild germplasm. *Crop Science*, 47: 44–59
- Adam M. W. 1996. An historical perspective on significant accomplishments in dry bean research. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*, 39: 33–45
- Adam-Blondon A. F., Sévignac M., Bannerot H., Dron M. 1994. SCAR, RAPD and RFLP markers linked to a dominant gene (are) conferring resistance to anthracnose in common bean. *Theoretical and Applied Genetics*, 88, 6–7: 865–870
- Afzal Z., Howton T. C., Sun Y., Mukhtar M. S. 2016. The roles of aquaporins in plant stress responses. *Journal of Developmental Biology*, 4: 9, doi: 10.3390/jdb1010009: 22 str.
- Alexandersson E., Frayse L., Sjövall-Larsen S., Gustavsson S., Fellert M., Karlsson M., Johanson U., Kjellbom P. 2005. Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Molecular Biology*, 59: 469–484
- Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, 17: 3389–3402
- Angioi S. A., Desiderio F., Rau D., Bitocchi E., Attene G., Papa R. 2009. Development and use of chloroplast microsatellites in phaseolus spp. and other legumes. *Plant Biology*, 11, 4: 598–612
- Angioi S. A., Rau D., Attene G., Nanni L., Bellucci E., Logozzo G., Negri V., Zeuli P. L. S., Papa R. 2010. Beans in Europe: Origin and structure of the European landraces of *Phaseolus Vulgaris* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 121, 5: 829–843
- Araújo S. S., Beebe S., Crespi M., Delbreil B., González E. M., Gruber V., Lejeune-Henaut I., Link W., Monteros M. J., Prats E., Rao I., Vadez V., Vaz Pato M. C. 2015. Abiotic stress responses in legumes: strategies used to cope with environmental challenges. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34, 1–3: 237–280
- Araus J. L., Slafer G. A., Reynolds M. P., Royo C. 2002. Plant breeding and drought in C-3 cereals: what should we breed for?. *Annals of Botany*, 89: 925–940
- Ariani A., Gepts P. 2015. Genome-wide identification and characterization of aquaporin gene family in common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). *Molecular Genetics and Genomics*, 290, 5: 1771–1785

- Arnoldi A., Zanoni C., Lammi C., Boschini G. 2015. The role of grain legumes in the prevention of hypercholesterolemia and hypertension. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34, 1–3: 144–168
- Aroca R., Fernante A., Vernieri P., Chrispeels M. J. 2006. Drought, abscisic acid and transpiration rate effects on the regulation of PIP aquaporin gene expression and abundance in *Phaseolus Vulgaris* plants. *Annals of Botany*, 98, 6: 1301–1310
- Asfaw A., Blair M. W., Struik P. C. 2012. multienvironment quantitative trait loci analysis for photosynthate acquisition, accumulation, and remobilization traits in common bean under drought stress. *G3*, 2, 5: 579–595
- Assefa T., Wu J., Beebe S. E., Rao I. M., Marcomin D., Claude R. J. 2015. Improving adaptation to drought stress in small red common bean: phenotypic differences and predicted genotypic effects on grain yield, yield components and harvest index. *Euphytica*, 203, 3: 477–489
- Babu R., Nair S.K., Prasanna B. M., Gupta H. S. 2004. Integrating marker-assisted selection in crop breeding-prospects and challenges. *Current Science*, 87, 5: 607–619
- Badri M., Chardon F., Huguet T., Aouani M. E. 2011. Quantitative trait loci associated with drought tolerance in the model legume *Medicago truncatula*. *Euphytica*, 181:415–428
- Bartels D. in Sunkar R. 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24, 1: 23–58
- Batista K. A., Prudêncio S. H., Fernandes K. F. 2010. Changes in the functional properties and antinutritional factors of extruded hard-to-cook common beans (*Phaseolus Vulgaris*, L.). *Journal of Food Science*, 75, 3: 86–90
- Beattie A. D., Larsen J., Michaels T. E., Pauls K. P. 2003. mapping quantitative trait loci for a common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) ideotype. *Genome*, 46, 3: 411–422
- Becerra Velasquez V. L. in Gepts P. 1994. RFLP diversity in common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). *Genome*, 37: 256–263
- Beebe S. 2012. Common bean breeding in the tropics. V: *Plant Breeding Reviews*. Janick J. (ur.). John Wiley & Sons, Inc. 36: 357–426
- Beebe S. E., Rao I. M., Blair M. W., Acosta-Gallegos J. A. 2013. Phenotyping common beans for adaptation to drought. *Frontiers in Physiology*, 4: 35, doi. 10.3389/fphys.2013.00035: 20 str.
- Beebe S. E., Rao I. M., Cajiao I., Grajales M. 2008. Selection for drought resistance in common bean also improves yield in phosphorus limited and favorable environments. *Crop Science*, 48: 582–592
- Beebe S. E., Skroch P. W., Tohme J., Duque M. C., Pedraza F., Nienhuis J. 2000. Structure of genetic diversity among common bean landraces of Mesoamerican origin based on correspondence analysis of RAPD. *Crop Science*, 40: 264–273

- Beebe S., Ramirez J., Jarvis A., Rao M. I., Mosquera G., Bueno M. J., Blair, W. M. 2011. Genetic improvement of common beans and the challenges of climate change. V: Crop Adaptation to Climate Change. Yadav S. S., Redden J. R., Hatfield L. J., Lotze-Campen H., Hall E. A. (ur.). Colombia: Blackwell Publishing Ltd., 1 ed.: 356–369
- Beebe S., Rengifo J., Gaitan E., Duque M. C., Tohme J. 2001. Diversity and origin of andean landraces of common bean. *Crop Science*, 41, 3: 854–862
- Beebe S., Skroch P. W., Tohme J., Duque M. C., Pedraza F., Nienhuis J. 2000. Structure of genetic diversity among common bean landraces of middle american origin based on correspondence analysis of RAPD. *Crop Science*, 40, 1: 264–273
- Bellucci E., Bitocchi E., Ferrarini A., Benazzo A., Biagetti E., Klie S., Minio A. 2014. decreased nucleotide and expression diversity and modified coexpression patterns characterize domestication in the common bean. *The Plant Cell*, 26, 5: 1901–1912
- Benchimol L.L., de Campos T., Carbonell S. A. M., Colombo C. A., Chioratto A. F., Formighieri E. F., Gouvêa L. R. L., de Souza A. P. 2007. Structure of genetic diversity among common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) varieties of Mesoamerican and Andean origins using new developed microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54, 8: 1747–1762
- Bhanu A. N., Singh M. N., Srivastava K., Hemantaranjan A. 2016. Molecular mapping and breeding of physiological traits. *Advances in Plants and Agriculture Research*, 3, 6: 00120, doi: 10.15406/apar.2016.03.00120, 25str.
- Bitocchi E., Bellucci E., Giardini A., Rau D., Rodriguez M., Biagetti E., Santilocchi R., Zeuli P. S., Gioia T., Logozzo G., Attene G., Nanni L. and Papa R.. 2013. Molecular analysis of the parallel domestication of the common bean (*Phaseolus Vulgaris*) in Mesoamerica and the Andes. *The New Phytologist*, 197, 1: 300–313
- Bitocchi E., Nanni L., Bellucci E., Rossi M., Giardini A., Zeuli P.S., Logozzo G., in sod. 2012. Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) is revealed by sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 14: 88–96
- Blair M.W., Torres M. M., Giraldo M. C., Pedraza F. 2009a. Development and diversity of Andean-derived, gene-based microsatellites for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC Plant Biology*, 9: 100, doi: 10.1186/1471-2229-9-100: 14 str.
- Blair M.W., Torres M.M., Pedraza F., Giraldo M.C., Buendía H.F., Hurtado N. 2009b. Development of microsatellite markers for common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) based on screening of non-enriched, small-insert genomic libraries. *Genome*, 52, 9: 772–782
- Blair M. W., Buendia H. F., Giraldo M. C., Métais I., Peltier D. 2008. Characterization of AT-rich microsatellites in common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 118: 91–103
- Blair M. W., Galeano C. H., Tovar E., Torres M. C. M., Castrillón A. V., Beebe S. E., Rao I. M. 2012. Development of a Mesoamerican intra-genepool genetic map for

- quantitative trait loci detection in a drought tolerant × susceptible common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) cross. *Molecular Breeding*, 29, 1: 71–88
- Blair M. W., Giraldo M. C., Buendía H. F., Tovar E., Duque M. C., Beebe S. E. 2006. Microsatellite marker diversity in common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 113, 1: 100–109
- Blair M. W., González L. F., Kimani P. M., Butare L. 2010. Genetic diversity, inter-gene pool introgression and nutritional quality of common beans (*Phaseolus Vulgaris* L.) from Central Africa. *Theoretical and Applied Genetics*, 121, 2: 237–248
- Blair M. W., Herrera A. L., Sandoval T. A., Caldas G. V., Filleppi M., Sparvoli F. 2012. Inheritance of seed phytate and phosphorus levels in common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) and association with newly-mapped candidate genes. *Molecular Breeding*, 30, 3: 1265–1277
- Blair M. W., Hurtado N., Chavarro C. M., Muñoz-Torres M. C., Giraldo M. C., Pedraza F., Tomkins J., Wing R. 2011. Gene-based SSR markers for common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) derived from root and leaf tissue ESTs: an integration of the BMc series. *BMC Plant Biology*, 11: 50, doi:10.1186/1471-2229-11-50: 10 str.
- Blair M. W., Iriarte G., Beebe S. 2006. QTL analysis of yield traits in an advanced backcross population derived from a cultivated andean x wild common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) cross. *Theoretical and Applied Genetics*, 112, 6: 1149–63
- Blair M. W., Pedraza F., Buendia H. F., Gaitán-Solís E., Beebe S. E., Gepts P., Tohme J. 2003. Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 107, 8: 1362–1374
- Blair M. W., Pedraza F., Buendia H. F., Gaitán-Solís E., Beebe S. E., Gepts P., Tohme J. 2003. Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 107, 8: 1362–1374
- Blair M. W., Sandoval T. A., Caldas G. V., Beebe S. E., Paez M. I. 2009. Quantitative trait locus analysis of seed phosphorus and seed phytate content in a recombinant inbred line population of common bean. *Crop Science*, 49: 237–246
- Blair M. W., Wu X., Bhandari D., Astudillo C. 2016. Genetic dissection of ICP-detected nutrient accumulation in the whole seed of common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). *Frontiers in Plant Science*, 7, doi: 10.3389/fpls.2016.00219: 9 str.
- Blum A. 2009. Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress. *Field Crops Research*, 112: 119–123
- Boersma J. G., Conner R. L., Balasubramanian P. M., Navabi A., Yu K., Hou A. 2013. Combining resistance to common bacterial blight, anthracnose, and bean common mosaic virus into Manitoba-adapted dry bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) cultivars. *Canadian Journal of Plant Science*, 94, 2: 405–415

- Borges A., Melotto M., Tsai S. M., Caldas D. G. G. 2012. Changes in spatial and temporal gene expression during incompatible interaction between common bean and anthracnose pathogen. *Journal of Plant Physiology*, 169, 12: 1216–1220
- Boursiac Y., Chen S., Luu D-T., Sorieul M., van den Dries N., Maurel C. 2005. Early effects of salinity on water transport in *Arabidopsis* roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiology*, 139: 790–805
- Boyer J. S. 1996. Advances in drought tolerance in plants. *Advances in Agronomy*, 56: 187–218
- Brestic M., Cornic G., Fryer M. J., Baker N. R. 1995. Does photorespiration protect the photosynthetic apparatus in French bean leaves from photoinhibition during drought stress? *Planta*, 196: 450–457
- Brick M. A. in Lowry G. 2000. Bean seed production in the western United States. V: Bean research, production and utilization. Proc of the Idaho Bean Workshop celebrating 75 years of bean research and development and 50 years of the cooperative dry bean nursery. Singh S. P. (ur.). University of Idaho, Twin Falls: 153–164
- Brodrribb T. 1996. Dynamics of Changing Intercellular CO₂ Concentration (C_i) during Drought and Determination of Minimum Functional C_i. *Plant Physiology*, 111, 1: 179–185
- Broughton W. J., Hernández G., Blair M., Beebe S., Gepts P., Vanderleyden J. 2003. Beans (*Phaseolus* Spp.) – Model Food Legumes. *Plant and Soil*, 252, 1: 55–128
- Budak H., Shearman R. C., Gaussoin R. E., Dweikat I. 2004. Application of sequence-related amplified polymorphism markers for characterization of turfgrass species. *HortScience*, 39, 5: 955–958
- Budič M., Šuštar-Vozlič J., Meglič V., Kos J., Kidrič M. 2013. characterization of two novel subtilases from common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) and their responses to drought. *Plant Physiology and Biochemistry*, 62: 79–87
- Budič M. 2009. Proteaze, vpletene v odziv navadnega fižola (*Phaseolus Vulgaris* L.) na vodni stres. Doktorska disertacija. Ljubljana, XX, 112 str.
- Buso G. S. C., Amaral Z. P. S., Brondani R. P. V., Ferreira M. E. 2006. Microsatellite markers for the common bean (*Phaseolus Vulgaris*). *Molecular Ecology Notes*, 6, 1: 252–254
- Ceylan A., Öcal N., Akbulut M. 2014. Genetic diversity among the Turkish common bean cultivars (*Phaseolus Vulgaris* L.) as assessed by SRAP, POGP and cpSSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 54: 219–229
- CGIAR. A global agricultural research partnership. 2016.
<http://www.cgiar.org/our-strategy/crop-factsheets/beans/> (20. 11. 2016)
- Chao W. S., Gu Y.-Q., Pautot V., Bray E. A., Walling L. L. 1999. Leucine aminopeptidase RNAs proteins, and activities increase in response to water deficit, salinity, and the

- wound signals systemin, methyl jasmonate, and abscisic acid. *Plant Physiology*, 120, 4: 979–992
- Charlson D. V., Bhatnagar S., King C. A., Ray J. D., Sneller C. H., Jr Carter T. E., Purcell L. C. 2009. Polygenic inheritance of canopy wilting in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Theoretical and Applied Genetics*, 119: 587–594
- Chaumont F. in Tyerman S. D. 2014. Aquaporins: highly regulated channels controlling plant water relations. *Plant Physiology*, 164: 1600–1618
- Chaves M. M. 1991. Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of Experimental Botany*, 42: 1–16
- Chaves M. M., Pereira J. S., Maroco J., Rodrigues M. L., Ricardo C. P. P., Osório M. L., Carvalho I., Faria T., Pinheiro C. 2002. How plants cope with water stress in the field? photosynthesis and growth. *Annals of Botany*, 89, 7: 907–916
- Checa O. E., Blair M. W. 2012. Inheritance of yield-related traits in climbing beans (L.). *Crop Science*, 52, 5: 1998–2013
- Cichy K. A., Blair M. W., Galeano Mendoza C. H., Snapp S. S., Kelly J. D. 2009. QTL analysis of root architecture traits and low phosphorus tolerance in an Andean bean population. *Crop Science*, 49, 1: 59–68
- Cichy K. A., Caldas G. V., Snapp S. S., Blair M. W. 2009. QTL analysis of seed iron, zinc, and phosphorus levels in an andean bean population. *Crop Science*, 49, 5: 1742–1750
- Collard B. C. Y., Jahufer M. Z. Z., Brouwer J. B., Pang E. C. K. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*, 142, 1–2: 169–196
- Contour-Ansel D., Torres-Franklin M. L., Zuily-Fodil Y., Cruz de Carvalho M. H. 2010. An aspartic acid protease from common bean is expressed 'on call' during water stress and early recovery. *Journal of Plant Physiology*, 167: 1606–1612
- Córdoba J. M., Chavarro C., Rojas F., Muñoz C., Blair M. W. 2010. Identification and mapping of simple sequence repeat markers from common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) bacterial artificial chromosome end sequences for genome characterization and genetic–physical map integration. *The Plant Genome Journal*, 3, 3: 154
- Córdoba J. M., Chavarro C., Schlueter J. A., Jackson S. A., Blair M. W. 2010. Integration of physical and genetic maps of common bean through BAC-derived microsatellite markers. *BMC Genomics*, 11: 436, doi: 10.1186/1471-2164-11-436: 10 str.
- Cornic G., Briantais J. M. 1991. Partitioning of photosynthetic electron flow between CO₂ and O₂ reduction in a C3 leaf (*Phaseolus Vulgaris* L.) at different CO₂ concentrations and during drought stress. *Planta*, 185, 2: 178–184
- Costa França M. G., Pham Thi A. T., Pimentel C., Pereyra Rossiello R. O., Zuily-Fodil Y., Laffray D. 2000. Differences in growth and water relations among *Phaseolus Vulgaris*

- cultivars in response to induced drought stress. *Environmental and Experimental Botany*, 43, 3: 227–237
- Costa Franca M. G., Thi A. T. P., Pimentel C., Rossiello R. O. P., Zuily-Fodil Y., Laffray D. 2000. Differences in growth and water relations among *Phaseolus Vulgaris* cultivars in response to induced drought stress. *Environmental and Experimental Botany*, 43: 227–237
- Costa G. E. A., Queiroz-Monici K. S., Reis S. M. P. M., Oliveira A. C. 2006. Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. *Food Chemistry*, 94, 3: 327–330
- Cruz de Carvalho M. H., d'Arcy-Lameta A., Roy-Macauley H., Gareil M., El Maarouf H., Pham-Thi A.-T., Zuily-Fodil Y. 2001. Aspartic protease in leaves of common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) and coVPea (*Vigna Unguiculata* L. Walp): Enzymatic activity, gene expression and relation to drought susceptibility. *FEBS Letters*, 492, 3: 242–2246
- Čerenak A., Javornik B. 2008. Osnove genskega kartiranja kmetijskih rastlin. *Hmeljarski bilten*, 15, 1
- Černe M. 1997. Stročnice. Ljubljana, Kmečki glas: 139 str.
- De Almeida Costa G. E., da Silva Queiroz-Monici K., Pissini Machado Reis S. M., de Oliveira A. C. 2006. Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. *Food Chemistry*, 94, 3: 327–330
- De Leonardis A. M., Petrarulo M., de Vita P., Mastrangelo A. M. 2012. Genetic and Molecular Aspects of Plant Response to Drought in Annual Crop Species. V: *Advances in Selected Plant Physiology Aspects*. Poglavlje 3. Dr. Montanaro G. (ur.). Rijeka, InTech: 45–74
- Delgado-Salinas A., Bibler R., Lavin M. 2006. Phylogeny of the Genus *Phaseolus* (Leguminosae): A recent diversification in an ancient landscape. *Systematic Botany*, 31, 4: 779–791
- De Rone A. M. (ur.). 2015. Grain legume. *Handbook of plant breeding*. Spain, str. 1-35
https://books.google.si/books?id=yVF1CgAAQBAJ&pg=PA14&lpg=PA14&dq=vendemark+et+al+2014&source=bl&ots=_DwoGsKruz&sig=CCTmNf8szShKY3MI1rhRvErD95A&hl=sl&sa=X&ved=0ahUKEwjhuYr9qJnRAhUCRhQKHZd2AV0Q6AEIQTAF#v=onepage&q=vendemark%20et%20al%202014&f=false (17. 9. 2016)
- Dramé K. N., Clavel D., Repellin A., Passaquet C., Zuily-Fodil Y. 2007. Water deficit induces variation in expression of stress-responsive genes in two peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars with different tolerance to drought. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45, 3-4: 236–243
- Dramé K. N., Passaquet C., Repellin A., Zuily-Fodil Y. 2013. Cloning, characterization and differential expression of a Bowman–Birk inhibitor during progressive water deficit

- and subsequent recovery in peanut (*Arachis hypogaea*) leaves. *Journal of Plant Physiology*, 170, 2: 225–229
- Du W. J., De-Yue Y., San-Xiong F. 2009. Analysis of QTLs for the trichome density on the upper and downer surface of leaf blade in soybean *Glycine max* (L.) Merr. *Agricultural Sciences China*, 8: 529–537
- Du W., Yu D., Fu S. 2009. Analysis of QTLs for the trichome density on the upper and downer surface of leaf blade in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Agricultural Sciences in China*, 8, 5: 529–537
- Duranti M. 2006. Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia*, 77, 2: 67–82
- Echt C., Knapp S., Liu B. H. 1992. Genome mapping with non-inbred crosses using Gmendel 2.0. *The Maize Genetics Cooperation Newsletter*, 66: 27–29
- Ender M., Terpstra K., Kelly J. D. 2008. Marker-assisted selection for white mold resistance in common bean. *Molecular Breeding*, 21, 2: 149–157
- Fageria N. K., dos Santos A. B., Moreira A. 2010. Yield, nutrient uptake, and changes in soil chemical properties as influenced by liming and iron application in common bean in a no-tillage system. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 41, 14: 1740–1749
- Fallen K., Banerjee S., Sheehan J., Addison D., Lewis L. M., Meiler J., Denton J. S. 2009. The kir channel immunoglobulin domain is essential for Kir1.1 (ROMK) thermodynamic stability, trafficking and gating. *Channels*, 3, 1: 57–68
- Fernández R., Herrero P., Fernández M. T., Moreno F. 1986. Mechanism of inactivation of hexokinase PII of *Saccharomyces cerevisiae* by D-Xylose. *Microbiology*, 132, 12: 3467–3472
- Ferreira J. L., de Souza Carneiro J. E., Teixeira A. L., de Lanes F. F., Cecon P. R., Borém A. 2007. Gene flow in common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). *Euphytica*, 153, 1–2: 165–170
- Fischer B. M., Salakhutdinov I., Akkurt M., Eibach R., Edwards K. J., Töpfer R., Zyprian E. M. 2004. Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. *Theoretical and Applied Genetics*, 108, 3: 501–515
- FAOSTAT. Food and Agriculture Organisation. 2014. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (22. 4. 2016)
- Ford R., Pang E. C. K., Taylor P. W. J. 1999. Genetics of resistance to ascochyta blight (*Ascochyta lentis*) of lentil and the identification of closely linked RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 93–98
- Frei A., Blair M. W., Cardona C., Beebe S. E., Gu H., Dorn S. 2005. QTL mapping of resistance to thrips palmi karny in common bean. *Crop Science*, 45, 1: 379–387

- Freyre R., Skroch P. W., Geffroy V., Adam-Blondon A.-F., Shirmohamadali A., Johnson W. C., Llaca V., Nodari R. O., Pereira P. A., Tsai S.-M., Tohme J., Dron M., Nienhuis J., Vallejos C. E., Gepts P. 1998. Towards an integrated linkage map of common bean. 4. Development of a core linkage map and alignment of RFLP maps. *Theoretical and Applied Genetics*, 97, 5–6: 847–856
- Gaitán-Solís E., Duque M. C., Edwards K. J., Tohme J. 2002. Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Crop Science*, 42, 6: 2128–2130
- Galeano C. H., Cortés A. J., Fernández A. C., Soler Á., Franco-Herrera N., Makunde G., Vanderleyden J., Blair M. W. 2012. Gene-based single nucleotide polymorphism markers for genetic and association mapping in common bean. *BMC Genetics* 13: 48
- Galeano C. H., Fernandez A. C., Franco-Herrera N., Cichy K. A., McClean P. E., Vanderleyden J., Blair M. W. 2011. Saturation of an intra-gene pool linkage map: towards a unified consensus linkage map for fine mapping and synteny analysis in common bean. *PLOS ONE*, 6, 12: e28135, doi:10.1371/journal.pone.0028135: 15 str.
- Galeano C. H., Fernández A. C., Gómez M., Blair M. W. 2009. Single strand conformation polymorphism based SNP and Indel markers for genetic mapping and synteny analysis of common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). *BMC Genomics*, 10: 629, doi:10.1186/1471-2164-10-629: 28 str.
- Garcia R. A. V., Rangel P. N., Bassinello P. Z., Brondani C., Melo L. C., Sibov S. T., Vianello-Brondani R. P. 2012. QTL mapping for the cooking time of common beans. *Euphytica*, 186, 3: 779–792
- Gepts P. 1998. Origin and evolution of common bean: past events and recent trends. *HortScience*, 33, 7: 1124–1130
- Gepts P. in Bliss F. A. 1988. Dissemination Pathways of Common Bean (*Phaseolus Vulgaris*, Fabaceae) Deduced from phaseolin electrophoretic variability. II. Europe and Africa. *Economic Botany*, 42, 1: 86–104
- Gepts P. in Debouck D. G. 1991. Origin, domestication, and evolution of the common bean, *Phaseolus Vulgaris*. V: Common beans: Research for crop improvement. Voysest O. in Van Schoonhoven A. (ur.). CAB Intern., Wallingford, Oxon, UK: 7–53
- Gepts P., Osborn T.C., Rashka K., Bliss F.A. 1986. Phaseolin-protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): evidence for multiple centers of domestication. *Economic Botany*, 40: 451–468
- Graham M. A., Ramírez M., Valdés-López O., Lara M., Tesfaye M., Vance C. P., Hernández G. 2006. Identification of candidate phosphorus stress induced genes in *Phaseolus Vulgaris* L. through clustering analysis across several plant species. *Functional Plant Biology*, 33: 789–797
- Gomes D., Agasse A., Thiébaud P., Delrot S., Gerós H., Chaumont F. 2009. Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788: 1213–1228

- Graham P. H., Ranalli P. 1997. Common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). Field Crops Research, 53: 131–146
- Grattapaglia D., Sederoff R. 1994. Genetic linkage maps of eucalyptus grandis and eucalyptus urophylla using a pseudo-testcross: Mapping strategy and RAPD markers. Genetics, 137, 4: 1121–1137
- Grisi M. C. M., Blair M. W., Gepts P., Brondani C., Pereira P. A. A., Brondani R. P. V. 2007. Genetic mapping of a new set of microsatellite markers in a reference common bean (*Phaseolus Vulgaris*) population BAT93 X Jalo EEP558. Genetics and Molecular Research, 6, 3: 691–706
- Hall T. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, 41: 95–98
- Habibi G. 2013. Effect of drought stress and selenium spraying on photosynthesis and antioxidant activity of spring barley. Acta Agriculturae Slovenica: 31–39
- Haley S. D., Miklas P.N., Afanador L.K., Kelly J.D. 1994. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker variability between and within gene pools of common bean. Journal of The American Society For Horticultural Science, 119: 122–125
- Hanai L. R., de Campos T., Camargo L. E. A., Benchimol L. L., de Souza A. P., Melotto M., Carbonell S. A. M., Chioratto A. F., Consoli L., Formighieri E. F., Siqueira M. V. B. M., Tsai S. M., Vieira M. L. C. 2007. Development, characterization, and comparative analysis of polymorphism at common bean SSR loci isolated from genic and genomic sources. Genome, 50, 3: 266–277
- Hanai L. R., Santini L., Camargo L. E. A., Fungaro M. H. P., Gepts P., Tsai S. M., Vieira M. L. C. 2010. Extension of the core map of common bean with EST-SSR, RGA, AFLP, and putative functional markers. Molecular Breeding, 25, 1: 25–45
- Hartl D. L. in Jones E. W. 2001. Genetics: Analysis of genes and genomes. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, MA: 854 str.
- Heckwolf M., Pater D., Hanson D. T., Kaldenhoff R. 2011. The *Arabidopsis thaliana* aquaporin AtPIP1;2 is a physiologically relevant CO₂ transport facilitator. Plant Journal, 67: 795–804
- Hieng B., Ugrinović K., Šuštar-Vozlič J., Kidrič M. 2004. Different Classes of Proteases Are Involved in the Response to Drought of *Phaseolus Vulgaris* L. Cultivars Differing in Sensitivity. Journal of Plant Physiology, 161, 5: 519–530
- Hougaard B. K., Madsen L. H., Sandal N., ... 2008. Legume anchor markers link syntenic regions between *Phaseolus vulgaris*, *Lotus japonicus*, *Medicago truncatula* and *Arachis*. Genetics, 179: 2299–2312
- Hoyos-Villegas V., Song Q., Wright E. M., Beebe S. E., Kelly J. D. 2016. Joint Linkage QTL Mapping for Yield and Agronomic Traits in a Composite Map of Three Common Bean RIL Populations. Crop Science, 56, 5: 2546–2563

- Huffaker R. C. 1990. Proteolytic activity during senescence of plants. *New Phytologist*, 116: 199–231
- Hussain S. S., Iqbal M. T., Arif M. A., Amjad M. 2011. Beyond osmolytes and transcription factors: drought tolerance in plants *via* protective proteins and aquaporins. *Biologia Plantarum*, 55, 3: 401–416
- Hyten D. L., Song Q., Fickus E. W., Quigley C. V., Lim J.-S., Choi I.-Y., Hwang E.-Y., Pastor-Corrales M., Cregan P. B. 2010. High-throughput SNP discovery and assay development in common bean. *BMC Genomics*, 11: 475, doi:10.1186/1471-2164-11-475: 5 str.
- IUBMB. International Union of Biochemistry and Molecular Biology. 2017. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/> (12. 3. 2017)
- Ivančič A. 2002. Hibridizacija pomembnejših rastlinskih vrst. Maribor, Fakulteta za kmetijstvo: 776 str.
- Jansen R. C., Stam P. 1994. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics*, 136, 4: 1447–1455
- Johanson U., Karlsson M., Johanson I., Gustavsson S., Sjövall S., Frayssé L., Weig A. R., Kjellbom P. 2001. The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiology*, 126: 1358–1369
- Kavar T., Maras M., Kidrič M., Šuštar-Vozlič J., Meglič V. 2008. Identification of genes involved in the response of leaves of *Phaseolus Vulgaris*. *Molecular Breeding*, 21, 2: 159–172
- Kelly J.D., Gepts P., Miklas P. N., Coyne D. P. 2003. Tagging and mapping of genes and qtl and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and coVPea. *Field Crops Research*, 82, 2–3: 135–154
- KEW. Royal Botanic Gardens. 2014. Plant DNA C-values database. <http://data.kew.org/cvalues/> (22. 11. 2016)
- Kidrič M., Kos J., Sabotič J. 2014. Proteases and their endogenous inhibitors in the plant response to abiotic stress. *Botanica Serbica*, 38, 1: 91–110
- Klaedtke S. M., Cajiao C., Grajales M., Polania J., Borrero G., Guerrero A., Rivera M., Rao I. M., Beebe S. E., Leon J. 2012. Photosynthate remobilization capacity from drought-adapted common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) lines can improve yield potential of interspecific populations within the secondary gene pool. *Journal of Plant Breeding, Crop Science*, 4: 49–61
- Koinange E. M. K., Singh S. P., Gepts P. 1996. Genetic control of the domestication syndrome in common bean. *Crop Science*, 36, 4: 1037–1045
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33, 7: 1870–1874

- Kwak M., Gepts P. 2009. Structure of genetic diversity in the two major gene pools of common bean (*Phaseolus Vulgaris* L., Fabaceae). *Theoretical and Applied Genetics*, 118, 5: 979–992
- Lander E. S., Botstein D. 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, 121, 1: 185–199
- 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 and Applied Genetics*, 103, 2–3: 455–461
- Li G., Santoni V., Maurel C. 2014. Plant aquaporins: Roles in plant physiology. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840: 1574–1582
- Lian H. L., Yu X., Lane D., Sun W. N., Tang Z. C., Su W. A. 2006. Upland rice and lowland rice exhibited different PIP expression under water deficit and ABA treatment. *Cell Research*, 16: 651–660
- Liu S. Y., Yu K., Huffner M., Park S. J., Banik M., Pauls K. P., Crosby W. 2010. Construction of a BAC library and a physical map of a major QTL for CBB resistance of common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). *Genetica*, 138, 7: 709–716
- Lincoln S., Daly M. in Lander E. 1993a. Constructing genetic linkage maps with MAPMAKER/EXP 3.0b, Ed. 3. Whitehead institute technical report. Whitehead Institute for Biomedical Research/MIT Center for Genome Research, Cambridge, MA.
- Lincoln S., Daly M. in Lander E. 1993b. Mapping genes controlling quantitative traits using MAPMAKER/QTL 1.1b, Ed. 2. Whitehead institute technical report. Whitehead Institute for Biomedical Research/MIT Center for Genome Research, Cambridge, MA
- Lizana C., Wentworth M., Martinez J. P., Villegas D., Meneses R., Murchie E. H., Pastenes C., Lercari B., Vernieri P., Horton P., Pinto M. 2006. Differential adaptation of two varieties of common bean to abiotic stress I. Effects of drought on yield and photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 57, 3: 685–697
- Lu H., Romero-Severson J., Bernardo R. 2002. Chromosomal regions associated with segregation distortion in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 105, 4: 622–628
- Ludlow M. M. 1980. Adaptive significance of stomatal responses to water stress. V: *Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress* Turner N. C., Kramer P. J., (ur.). New York, USA: John Wiley and Sons: 23–128
- Luu D. T., in Maurel C. 2005. Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. *Plant Cell Environment*, 28: 85–96
- Madhujith T., Naczek M., Shahidi F. 2004. Antioxidant activity of common beans (*Phaseolus Vulgaris* L.). *Journal of Food Lipids*, 11, 3: 220–233
- Manly K. F., Cudmore R. H., Meer J. M. 2001. Map Manager QTX, Cross-platform software for genetic mapping. *mammalian genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society*, 12, 12: 930–932

- Maras M. 2007. Karakterizacija slovenskih genskih virov navadnega fižola (*Phaseolus Vulgaris* L.) z morfološkimi, biokemijskimi in molekulskimi markerji. Doktorska disertacija. Ljubljana: 134 str.
- Maras M., Šuštar-Vozlič J., Javornik B., Meglič V. 2008. The efficiency of AFLP and SSR markers in genetic diversity estimation and gene pool classification of common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). *Acta agriculturae Slovenica*, 91: 87–96
- Maras M., Šuštar-Vozlič J., Kainz W., Meglič V. 2013. Genetic diversity and dissemination pathways of common bean in Central Europe. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 138, 4: 297–305
- Marotti I., Bonetti A., Minelli M., Catizone P., Dinelli G. 2007. characterization of some italian common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) landraces by RAPD, semi-random and ISSR molecular markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54, 1: 175–188
- Maurel C., Verdoucq L., Luu D. T., Santoni V. 2008. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 595–624
- McClellan P. E., Terpstra J., McConnell M., White C., Lee R., Mamidi S. 2012. Population structure and genetic differentiation among the USDA common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) core collection. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59, 4: 499–515
- McConnell M., Mamidi S., Lee R., Chikara S., Rossi M., Papa R., McClellan P. 2010. Syntenic relationships among legumes revealed using a gene-based genetic linkage map of common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 121, 6: 1103–1116
- Métais I., Hamon B., Jalouzot R., Peltier D. 2002. Structure and level of genetic diversity in various bean types evidenced with microsatellite markers isolated from a genomic enriched library. *Theoretical and Applied Genetics*, 104, 8: 1346–1352
- MEROPS. The Peptidase Database. 2017. <http://merops.sanger.ac.uk/> (12. 3. 2017)
- Michelmore R. W., Paran I., Kesseli R. V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 21: 9828–9832
- Miklas P. N., Hu J. G., Grunwald N. J., Larsen K. M. 2006. Potential application of TRAP (Targeted Region Amplified Polymorphism) markers for mapping and tagging disease resistance traits in common bean. *Crop Science*, 46, 2: 910–916
- Mir R. R., Zaman-Allah M., Sreenivasulu N., Trethowan R., Varshney R. K. 2012. Integrated genomics, physiology and breeding approaches for improving drought tolerance in crops. *Theoretical and Applied Genetics*, 125, 4: 625–645

- Mohan M., Nair S., Bhagwat A., Krishna T. G., Yano M., Bhatia C. R., Sasaki T. 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding*, 3: 87–103
- Montalvo-Hernández L., Piedra-Ibarra E., Gómez-Silva L., Lira-Carmona R., Acosta-Gallegos J. A., Vazquez-Medrano J., Xoconostle-Cázares B., Ruíz-Medrano R. 2008. Differential accumulation of mRNAs in drought-tolerant and susceptible common bean cultivars in response to water deficit. *New Phytologist*, 177, 1: 102–113
- Moreira S. O., de Moraes Silva M. G., Rodrigues R., Viana A.P., Pereira M.G. 2010. Breeding methods and history of bean cultivars released in CBAB. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 10, 4: 345–350
- Mukeshimana G., Lasley A. L., Loescher W. H., Kelly J. D. 2014. Identification of shoot traits related to drought tolerance in common bean seedlings. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 139, 3: 299–309
- Munoz-Perea C. G., Teran H., Allen R. G., Wright J. L., Westermann D. T., Singh S. P. 2006. Selection for drought resistance in dry bean landraces and cultivars. *Crop Science*, 46: 2111–2120
- Mutlu N., Miklas P. N., Coyne D. P. 2006. Resistance gene analog polymorphism (RGAP) markers co-localize with disease resistance genes and QTL in common bean. *Molecular Breeding*, 17, 2: 127–135
- Nemecek T., von Richthofen J.-S., Dubois G., Casta P., Charles R., Pahl H. 2008. Environmental impacts of introducing grain legumes into European crop rotations. *European Journal of Agronomy*, 28, 3: 380–393
- Nishant B., Singh M. N., Srivastava K., Hemantaranjan A. 2016. molecular mapping and breeding of physiological traits. *Advances in Plants & Agriculture Research*, 3, 6: 1–15
- Nodari R. O., Tsail S. M., Gilbertson R. L., Gepts P. 1993. Towards an integrated linkage map of common bean 2. Development of an RFLP-based linkage map. *Theoretical and Applied Genetics*, 85, 5: 513–520
- Ochoa I. E., Blair M. W., Lynch J. P. 2006. QTL analysis of adventitious root formation in common bean under contrasting phosphorus availability. *Crop Science*, 46, 4: 1609–1621
- Osakabe Y., Osakabe K., Shinozaki K., Tran P. L.-S. 2014. Response of plants to water stress. *Frontiers in Plant Science*, 5: 86, doi: 10.3389/fpls.2014.00086: 8 str.
- Park S. O., Coyne D. P., Jung G., Skroch P. W., Arnaud-Santana E., Steadman J. R., Ariyaratne H. M., Nienhuis J. 2000. Mapping of QTL for seed size and shape traits in common bean. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125, 4: 466–475

- Park W., Scheffler B. E., Bauer P. J., Campbell B. T. 2010. Identification of the family of aquaporin genes and their expression in upland cotton (*Gossypium Hirsutum* L.). BMC Plant Biology, 10, 1: 142, doi: 10.1186/1471-2229-10-142: 17 str.
- Park W. J. in Campbell B. T. 2015. Aquaporins as targets for stress tolerance in plants: genomic complexity and perspectives. Turkish Journal of Botany, 39: 879–886
- Paterson A. H., Lan T. H., Reischmann K. P., Chang C., Lin Y. R., Liu S. C., Burow M. D., Kowalski S. P., Katsar C. S., DelMonte T. A., Feldmann K. A., Schertz K. F., Wendel J. F. 1996. Toward a unified genetic map of higher plants, transcending the monocot-dicot divergence. Nature Genetics, 14, 4: 380–382
- Pedrosa-Harand A., Porch T., Gepts P. 2008. Standard nomenclature for common bean chromosomes and linkage groups. annual report.
<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300897412> (9. 2. 2017)
- Peoples M. B., Brockwell J., Herridge D. F., Rochester I. J., Alves B. J. R., Urquiaga S., Boddey R. M., Dakora F. D., Bhattarai S., Maskey S. L., Sampet C., Rerkasem B., Khan D. F., Hauggaard-Nielsen H., Jensen E. S. 2009. The contributions of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems. Symbiosis, 48, 1–3: 1–17
- Peoples M. B., Hauggaard-Nielsen H., Jensen E. S. 2009. The potential environmental benefits and risks derived from legumes in rotations. Nitrogen Fixation in Crop Production agronomymonogra (nitrogenfixatio): 349–385
- Perez-Clemente R. M., Vives V., Zandalinas S. I., Lopez-Climent M. F., Munoz V., Gomez-Cadenas A. 2012. Biotechnological approaches to study plant responses to stress, biotechnological approaches to study plant responses to stress. BioMed Research International, 2013: ID: 654120, doi:10.1155/2013/654120: 10 str.
- Pereira Vianello R. in Brondani C. 2014. Common bean gene mapping for molecular improvement. Legum perspectives. Phaseolus: A new world gift to mankind. Why common beans are so common? The Journal of the International Legume Society, 2: 20–21
- Pérez-Vega E., Pascual A., Campa A., Giraldez R., Miklas P. N., Ferreira J. J. 2010. Mapping quantitative trait loci conferring partial physiological resistance to white mold in the common bean RIL population Xana × Cornell 49242. Molecular Breeding, 29, 1: 31–41
- PHYTOZOME. The Plant Genomics Resource. 2014. California, JGI – Joint Genome Institute, A Doe Office of Science User Facility.
<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html> (22. 11. 2016)
- Pinheiro C., Kehr J., Richardo C. P. 2005. Effect of water stress on lupin stem protein analysed by two-dimensional gel electrophoresis. Planta, 221, 5: 716–728
- Pontes Júnior V. A., Melo P. G. S., Pereira H. S., Melo L. C. 2016. Genetic potential of common bean progenies obtained by different breeding methods evaluated in various

- environments. *Genetics and Molecular Research*, 15, 3, doi: 10.4238/gmr.15038622: 10 str.
- Qian Z-J., Song J-J., Chaumont F., Ye Q. 2015. Differential responses of plasma membrane aquaporins in mediating water transport of cucumber seedlings under osmotic and salt stresses. *Plant, Cell & Environment*, 38: 461–473
- Rafalski J. A. 2010. Association genetics in crop improvement. *Current Opinion in Plant Biology*, 13, 2: 174–180
- Ramvalho M. A. P., Santos J. B., Abreu A. F. B., Nunes J. A. R. 2012. Aplicações da genética quantitativa no melhoramento de plantas autógamas. UFLA (ur.): 522 str.
<http://www.ciadoslivos.com.br/aplicacoes-da-genetica-quantitativa-no-melhoramento-de-plantas-autogamas-629280-p546356> (9. 2. 2017)
- Ramirez-Vallejo P., Kelly J.D. 1998. Traits related to drought resistance in common bean. *Euphytica*, 99, 2: 127–136
- Rao I. M. 2001. Role of physiology in improving crop adaptation to abiotic stresses in the tropics: The case of common bean and tropical forages. V: *Handbook of Plant and Crop Physiology*. Pessarakli M. (ur.). Marcel Dekker, Inc, New York, USA: 583–613
- Rao I. M., Beebe S. E., Polanía J., Grajales M. A., Cajiao C., García R., Ricaurte J., Rivera M. 2009. Physiological basis of improved drought resistance in common bean: The contribution of photosynthate mobilisation to grain. Paper presented at Interdrought III: The 3rd International Conference on Integrated Approaches to Improve Crop Production under Drought-Prone Environments, October 11-16, 2009, Shanghai, China. Shanghai Academy of Agriculture Science, Shanghai, China: 237 str.
- Rao I. M., Beebe S. E., Polanía J., Ricaurte J., Cajiao C., Garcia R., Rivera M. 2013. Can tepary bean be a model for improvement of drought resistance in common bean? *African Crop Science Journal*, 21, 4: 265–281
- Raposo F. V., Ramvalho M. A. P., Abreu A. D. F. B. 2000. Comparação de métodos de condução de populações segregantes do feijoeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35, 10: 1991–1997
- Razinger J., Drinovec L., Šuštar-Vozlič J., Čremožnik B., Meglič V., Čerenak A. 2010. Physiological response of common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) to drought stress. *Hmeljarski bilten*, 17: 44–56
- Recchia G., Caldas D., Beraldo A., da Silva M., Tsai S. 2013. Transcriptional analysis of drought-induced genes in the roots of a tolerant genotype of the common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 4: 7155–7179
- Reflinur K. B., Jang S. M., Chu S.-H., Bordiya Y., Akter M. B., Lee J., Chin J. H., Koh H.-J. 2014. Analysis of segregation distortion and its relationship to hybrid barriers in rice. *Rice*, 7, 1: 3, doi: 10.1186/s12284-014-003-8: 12 str.
- Ribaut J.-M., Hoisington D. 1998. Marker-Assisted Selection: New tools and strategies. *Trends in Plant Science*, 3, 6: 236–239

- Risch N. 1992. Genetic linkage: interpreting lod scores. *Science*, 255: 803-804
- Rodiño A. P., Drevon J.-J. 2004. Migration of a grain legume, *Phaseolus Vulgaris*, in Europe. V: *Biological Resources and Migration*. Prof. dr. Dietrich Werner D. (ur.). Berlin, Heidelberg, Springer: 61–71
- Rodríguez-Suárez C., Méndez-Vigo B., Pañeda A., Ferreira J. J., Giraldez R. 2007. A genetic linkage map of *Phaseolus Vulgaris* L. and localization of genes for specific resistance to six races of anthracnose (*Colletotrichum Lindemuthianum*). *Theoretical and Applied Genetics*, 114, 4: 713–722
- Rosales M. A., Cuellar-Ortiz S. M., de la Paz Arrieta-Montiel M., Acosta-Gallegos J., Covarrubias A. A. 2012a. Physiological traits related to terminal drought resistance in common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 2: 324–331
- Rosales M. A., Ocampo E., Rodríguez-Valentín R., Olvera-Carrillo Y., Acosta-Gallegos J., Covarrubias A. A. 2012b. Physiological analysis of common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) cultivars uncovers characteristics related to terminal drought resistance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 56: 24–34
- Rossi M., Bitocchi E., Bellucci E., Nanni L., Rau D., Attene G., Papa R. 2009. Linkage disequilibrium and population structure in wild and domesticated populations of *Phaseolus Vulgaris* L. *Evolutionary Applications*, 2, 4: 504–522
- Roy-Macauley H., Zuily-Fodil Y., Kidric M., Thi A. T. P., de Silva J. V. 1992. Effect of drought stress on proteolytic activities in *Phaseolus* and *Vigna* leaves from sensitive and resistant plants. *Physiologia Plantarum*, 85, 1: 90–96
- Ruiz-Nieto J. E., Aguirre-Mancilla C. L., Acosta-Gallegos J. A., Raya-Pérez J. C., Piedra-Ibarra E., Vázquez-Medrano J., Montero-Tavera V. 2015. Photosynthesis and chloroplast genes are involved in water-use efficiency in common bean. *Plant Physiology and Biochemistry*, 86: 166–173
- Saitou N., Nei M. 1987. The Neighbor-Joining Method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 4: 406–425
- Sakurai J., Ishikawa F., Yamaguchi T., Uemura M., Maeshima M. 2005. Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. *Plant Cell Physiology*, 46: 1568–1577
- Sambrook J., Russell D. W. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2344 str.
- Santos M. G., Ribeiro R. V., Machado E. C., Pimentel C. 2009. Photosynthetic parameters and leaf water potential of five common bean genotypes under mild water deficit. *Biologia Plantarum*, 53, 2: 229–236

- Scaboo A. M., Pantalone V. R., Walker D. R., Boerma H. R., West D. R., Walker F. R., Sams C. E. 2009. Confirmation of molecular markers and agronomic traits associated with seed phytate content in two soybean RIL populations. *Crop Science*, 49, 2: 426–432
- Schmutz J., McClean P.E., Mamidi S., Wu G.A., Cannon S. B., Grimwood J., Jenkins J., in sod. 2014. A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nature Genetics*, 46, 7: 707–713
- Schneider K. A., Brothers M. E., Kelly J. D. 1997. Marker-assisted selection to improve drought resistance in common bean. *Crop Science*, 37, 1: 51–60
- Schneider K. A., Rosales-Serna R., Ibarra-Perez F., Cazares-Enriquez B., Acosta-Gallegos J. A., Ramirez-Vallejo P., Wassimi N., Kelly J.D. 1997. Improving common bean performance under drought stress. *Crop Science*, 37, 1: 43–50
- Seki M., Narusaka M., Ishida J., Nanjo T., Fujita M., Oono Y., Kamiya A., Nakajima M., Enju A., Sakurai T., Satou M., Akiyama K., Tajiguchi-Shinozaki K., Carninci P., Kawai J., Hayashizaki Y., Shinozaki K. 2002. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *The Plant Journal*, 31, 3: 279–292
- Semagn K., Bjørnstad Å., Ndjiondjop M. N. 2006. Principles, Requirements and prospects of genetic mapping in plants. *African Journal of Biotechnology*, 5, 25
- Shao H.-B., Chu L.-Y., Jaleel C. A., Zhao C.-X. 2008. Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Comptes Rendus Biologies*, 331, 3: 215–225
- Scholander P. F., Bradstreet E. D., Hemmingsen E. A., Hammel H. T. 1965. Sap pressure in vascular plants. *Science*, 148, 3668: 339–346
- Schwartz H. F., Steadman J. R., Hall R. 2005. Anthracnose. V: Compendium of bean diseases. 2nd ed. Schwartz H. F., Steadman J. R., Hall R., Forster R. L. (ur.). St. Paul, Minn., APS Press, American Phytopathological Society, 8: 109
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 58, 2: 221–227
- Silva V. M. P., Menezes Júnior J. A. N., Carneiro P. C. S., Carneiro J. E. S., Cruz C. D. 2013. Genetic improvement of plant architecture in the common bean. *Genetics and Molecular Research*, 12, 3: 3093–3102
- Simova-Stoilova L., Vaseva I., Grigorova B., Demirevska K., Feller U. 2010. Proteolytic activity and cysteine protease expression in wheat leaves under severe soil drought and recovery. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48: 200–206
- Sinclair L. A., Blake C. W., Griffin P., Jones G. H. 2012. The partial replacement of soybean meal and rapeseed meal with feed grade urea or a slow-release urea and its effect on the performance, metabolism and digestibility in dairy cows. *Animal*, 6: 920–927

- Singh S. P. 1999. Common bean improvement in the twenty-first century. Singh S. P. (ur.) Springer. <http://www.springer.com/us/book/9780792358879> (9. 2. 2017)
- Singh S. P., Gepts P., Debouck D. G. 1991. Races of common bean (*Phaseolus Vulgaris*, Fabaceae). Economic Botany, 45, 3: 379–396
- Singh S. P., Terán H., Lema M., Webster D. M., Strausbaugh C. A., Miklas P. N., Schwartz H. F., Brick M. A. 2007. Seventy-five years of breeding dry bean of the western USA. Crop Science, 47: 981–989
- Singh S. P., Teran H., Schwartz H. F., Otto K., Lema M. 2009. Introgressing white mold resistance from *Phaseolus* species of the secondary gene pool into common bean. Crop Science, 49, 5: 1629–1637
- Singh S., Schwartz H. 2010. Review: Breeding common bean for resistance to insect pests and nematodes. Canadian Journal of Plant Science, 91, 2: 239–250
- Souza T. L. P. O., Faleiro F. G., Dessaune S. N., de Paula-Junior T. J., Moreira M. A., de Barros E. G.. 2013. Breeding for common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) rust resistance in Brazil. Tropical Plant Pathology, 38, 5: 361–374
- Sparvoli F. in Bollini R. 2014. Nutritional quality of common bean: more nutrients or less antinutrients? Legume Perspectives, 2: 50–53
- Sponchiado B. N., White J. W., Castillo J. A., Jones P. G. 1989. Root growth of four common bean cultivars in relation to drought tolerance in environments with contrasting soil types. Experimental Agriculture, 25: 249–257
- Stam P. 1993. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: Join Map. The Plant Journal, 3, 5: 739–744
- Sturtevant A. H. 1913. The linear arrangement of six sex-linked factors in drosophila, as shown by their mode of association. Journal of Experimental Zoology, 14, 1: 43–59
- Suiter K.mA., Wendel J.mF. in Case J. S.. 1983. LINKAGE 1: a PASCAL computer program for detection and analysis of genetic linkage. Journal of Heredity, 74: 203–204
- Šubanovski N., Sargent D. J., Else M. A., Simpson D. W., Zhang H., Grant O. M. 2013. Expression of *Fragaria vesca* PIP aquaporins in response to drought stress: PIP down-regulation correlates with the decline in substrate moisture content. PLOS ONE, 8: e74945, doi: 10.1371/journal.pone.0074945: 12 str.
- Šuštar-Vozlič J., Černe M., Meglič V. 2000. Genetska variabilnost fižola v Sloveniji. Sodobno kmetijstvo, 33, 9: 378–379
- Šuštar-Vozlič J., Maras M., Javornik B., Meglič V. 2006. Genetic diversity and origin of Slovene common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm as revealed by AFLP markers and phaseolin analysis. Journal of the American Society for Horticultural Science, 131, 2: 242–249
- Šuštar-Vozlič J., Maras M., Munda A., Zadražnik T., Meglič V. 2012. Raznolikost fižola v zbirki Kmetijskega inštituta Slovenije = Variability of common bean accessions in the

- gene bank of Agricultural institute of Slovenia. Acta agriculturae Slovenica, 99, 3: 399–411 <http://aas.bf.uni-lj.si/december2012/15Sustar-Vozlic.pdf> (9. 2. 2017)
- Šuštar-Vozlič J., Maras M., Zadražnik T., Zupin M., Sedlar A., Kidrič M., Razinger J., Meglič V. 2015. Drought stress response of common bean and development of genetic map for QTL analysis. V: *V Meeting AEL : Plant proteins for the future*. De Ron A. M. (ur.). Pontevedra: Spanish Association for Legumes (AEL), Actas AEL, 6: 171
- Šuštar-Vozlič J., Ugrinović K., Munda A., Meglič V. 2017. 'Češnjevec pisani visoki' in 'Lišček rdeči marmorirani': novi ohranjevalni sorti fižola vpisani v Sortno listo Republike Slovenije = 'Češnjevec pisani visoki' and 'Lišček rdeči marmorirani': New conservation varieties inscribed in the National List of Varieties. V: *Novi izzivi v agronomiji 2017 : zbornik simpozija = New challenges in agronomy 2017 : proceedings of symposium*. Čeh B., Dolničar P., Mihelič R., Stajnko D., Šantavec I. (ur.). Ljubljana, Slovensko agronomsko društvo: 52–57
http://www.agronomsko-drustvo.si/files/novi_izzivi_2017.pdf (9. 2. 2017)
- Tanksley S. D. 1993. Mapping polygenes. Annual Review of Genetics, 27: 205–233
- Tar'an B., Michaels T. E., Pauls K. P. 2002. genetic mapping of agronomic traits in common bean. Crop Science, 42, 2: 544–556
- Terán H., Lema M., Webster D., Singh S. P. 2009. 75 Years of breeding pinto bean for resistance to diseases in the united states. Euphytica, 167, 3: 341–351
- Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D. G. 1997. The CLUSTAL_X Windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 25 24: 4876–4882
- Terzi R., Saglam A., Kutlu N., Nar H., Kadioglu A. 2010. Impact of soil drought stress on photochemical efficiency of photosystem II and antioxidant enzyme activities of *Phaseolus Vulgaris* cultivars. Turkish Journal of Botany, 34, 1
- Tohme J., Gonzalez D. O., Beebe S., Duque M. C. 1996. AFLP Analysis of gene pools of a wild bean core collection. Crop Science, 36, 5: 1375–1384
- Torga P. P., Melo P. G. S., Pereira H. S., de Faria L. C., Peloso M. J. D., Melo L. C. 2013. Interaction of common beans cultivars of the black group with years, locations and sowing seasons. Euphytica, 189, 2: 239–248
- Trapp J. J. 2015. Genetics of drought tolerance in common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). Ph.D., United States - Washington: Washington State University.
<http://search.proquest.com/pqdtglobal/docview/1711732277/abstract/5EB76ED6A7A94F20PQ/1> (9. 2. 2017)
- Tsiatsiani L., Gevaert K., Van Breusegem F. 2012. Natural substrates of plant proteases: how can protease degradomics extend our knowledge? Physiologia Plantarum, 145: 28–40

- Uehlein N., Sperling H., Heckwolf M., Kaldenhoff R. 2012. The Arabidopsis aquaporin PIP1;2 rules cellular CO₂ uptake. *Plant Cell Environment*, 35: 1077–1083
- USDA Composition Databases. 2016: Nutrient Lists
<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/nutrients/report?nutrient1=208&nutrient2=205&nutrient3=203&fg=16&max=25&subset=0&offset=100&sort=f&totalCount=375&measureby=g> (9. 2. 2017)
- Vales M., Ségué L., Bouzinac S., Taillebois J. 2009. improvement of cropping systems by integration of rice breeding: A novel genetic improvement strategy. *Euphytica*, 167, 2: 161–164
- Vallejos C. E., Sakiyama N. S., Chase C. D. 1992. A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus Vulgaris* L. *Genetics*, 131, 3: 733–740
- Van der Hoorn R. A. L. 2008. Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 191–223
- Van Ooijen J., Voorrips R. E. 2001. JoinMap 3.0, software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International. Wageningen, Netherlands
- Vandecasteele C., Teulat-Merah B., Morère-Le Paven M.-C., Leprince O., Ly Vu B., Viau L., Ledroit L., Pelletier S., Payet N., Satour P., Lebras C., Gallardo K., Huguet T., Limami A. M., Prosperi J. M., Buitink J. 2011. quantitative trait loci analysis reveals a correlation between the ratio of sucrose/raffinose family oligosaccharides and seed vigour in medicago truncatula. *Plant, Cell & Environment*, 34, 9: 1473–1487
- Vandeleur R. K., Mayo G., Shelden M. C., Gilliam M., Kaiser B. N., Tyerman S. D. 2009. The role of plasma membrane intrinsic protein aquaporins in water transport through roots: diurnal and drought stress responses reveal different strategies between isohydric and anisohydric cultivars of grapevine. *Plant Physiology*, 149: 445–460
- Vandemark G. J., Brick M. A., Osorno J. M., Kelly J. D., Urrea C. A. 2014. Edible Grain Legumes. V: Yield Gains in Major U.S. Field Crops cssaspecialpubl (yieldgainsinmaj). Smith S., Diers B., Specht J., Carver B. (ur.). USA: 87–124
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biological*, 3: research0034, 12 str. <http://genomebiology.com/2002/3/7/research/0034> (10. 5. 2016)
- Vaseva I., Sabotič J., Šuštar-Vozlič J., Meglič V., Kidrič M., Demirevska K., Simova-Stoilova L. 2011. The response of plants to drought stress: The role of dehydrins, chaperones, proteases and protease inhibitors in maintaining cellular protein function. V: Droughts: New Research. Neves D. F. and Sanz J. D. (ur.). Sofia, Bulgaria: 1-45
https://www.researchgate.net/publication/260056670_Vaseva_et_al_Droughts_New_Research_2012_ch1 (3. 4. 2016)
- Vera-Estrella R., Barkla B. J., Bohnert H. J., Pantoja O. 2004. Novel regulations of aquaporins during osmotic stress. *Plant Physiology*, 135: 2318–2329

- Verma P., Goyal R., Chahota R. K., Sharma T. R., Abdin M. Z., Bhatia S. 2015. construction of a genetic linkage map and identification of QTLs for seed weight and seed size traits in lentil (*Lens culinaris* Medik.). PLoS ONE, 10, 10: e0139666. doi:10.1371/journal.pone.0139666
- Vierstra R. D. 1993. Protein degradation in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 44, 1: 385–410
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., van de Reijans M., Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, 23, 21: 4407–4414
- Vu J. C. V., Allen L. H., Boote K. J., Bowes G. 1997. Effects of elevated CO₂ and temperature on photosynthesis and rubisco in rice and soybean. Plant, Cell & Environment, 20, 1: 68–76
- Wang G. in Paterson A. H. 1994. Assessment of DNA pooling strategies for mapping of QTLs. Theoretical and Applied Genetics, 88: 355–361
- Wang S., Basten C. J. in Zeng Z.-B. 2012. Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC: 93 str. <http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm> (9. 2. 2017)
- White J. W. in Castillo J. A. 1988. Studies at CIAT on mechanisms of drought tolerance in bean. V: Research on Drought Tolerance in Common Bean. Working Document No. 41 White J. W., Hoogenboom J. W. D., Ibarra F., Singh S. P. (ur.). Cali, Colombia; CIAT: 146–164
- White J. W., Castillo J. A. 1992. Evaluation of diverse shoot genotypes on selected root genotypes of common bean under soil water deficits. Crop Science, 32: 762–765
- White J. W., Singh S. P. 1991. Sources and inheritance of earliness in tropically adapted indeterminate common bean. Euphytica, 55, 1: 15–19
- White P. J., Brown P. H. 2010. Plant nutrition for sustainable development and global health. Annals of Botany, 105, 7: 1073–1080
- Yamagishi M., Takeuchi Y., Tanaka I., Kono I., Murai K., Yano M. 2010. Segregation distortion in F(2) and doubled haploid populations of temperate japonica rice. Journal of Genetics, 89, 2: 237–241
- Yang Z.-B., Eticha D., Fuhr H., Heintz D., Ayoub D., Van Dorsselaer A., Schlingmann B., Rao I. M., Braun H.-P., Horst W. J. 2013. Proteomic and phosphoproteomic analysis of polyethylene glycol-induced osmotic stress in root tips of common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). Journal of Experimental Botany, 64, 18: 5569–5586
- Yoo C. Y., Pence H. E., Jin J. B., Miura K., Gosney M. J., Hasegawa P. M., Mickelbart M. V. 2010. The Arabidopsis GTL1 Transcription factor regulates water use efficiency and drought tolerance by modulating stomatal density via transrepression of SDD1. The Plant Cell, 22, 12: 4128–4141

- Yordanov V., Velikova T., Tsonev V. 2003. Plant responses to drought and stress tolerance. Bulgarian Journal of Plant Physiology, Special Issue: 187–206
- Young N. D. 1994. Constructing a plant genetic linkage map with DNA markers. V: DNA-Based Markers in Plants. Phillips R. L., Vasil I. K. (ur.). Advances in Cellular and Molecular Biology of Plants 1. Springer, Netherlands: 39–57
- Yu K., Park S. J., Poysa V., Gepts P. 2000. Integration of simple sequence repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). The Journal of Heredity, 91, 6: 429–434
- Yuste-Lisbona F. J., González A. M., Capel C., García-Alcázar M., Capel J., Ron A. M. D., Lozano R., Santalla M. 2014. Genetic analysis of single-locus and epistatic QTLs for seed traits in an adapted × Nuña RIL population of common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). Theoretical and Applied Genetics, 127, 4: 897–912
- Zadražnik T., Hollung K., Egge-Jacobsen W., Meglič V., Šuštar-Vozlič J. 2013. Differential proteomic analysis of drought stress response in leaves of common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). Journal of Proteomics, 78: 254–272
- Zargar S. M., Farhat S., Mahajan R., Bhakhri A., Sharma A. 2015. Unraveling the efficiency of RAPD and SSR markers in diversity analysis and population structure estimation in common bean. Saudi Journal of Biological Sciences, 23, 1: 139–149
- Zeng Z. B. 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. Genetics, 136, 4: 1457–1468
- Zeven A. C. 1997. The introduction of the common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) into Western Europe and the phenotypic variation of dry beans collected in the Netherlands in 1946. Euphytica, 94, 3: 319–328
- Zhang L. P., Lin G. Y., Niño-Liu D., Foolad M. R. 2003. Mapping QTLs conferring early blight (*Alternaria Solani*) resistance in a *Lycopersicon esculentum* × *L. Hirsutum* Cross by selective genotyping. Molecular Breeding, 12, 1: 3–19
- Zhang L. Y., Wang S. Q., Li H. H., Deng Q. M., Zheng A. P., Li S. C., Li P., Li Z. L., Wang J. K. 2010. Effects of missing marker and segregation distortion on QTL mapping in F2 populations. Theoretical and Applied Genetics, 121: 1071–1082
- Zhang L., Lin G. Y., Niño-Liu D. O., Foolad M. R. 2003. Mapping QTLs conferring early blight (*Alternaria solani*) resistance in a *Lycopersicon esculentum* × *L. hirsutum* cross by selective genotyping. Molecular Breeding, 12: 3–19
- Zhang L., Wang S., Li H., Deng Q., Zheng A., Li S., Li P., Li Z., Wang J. 2010. Effects of missing marker and segregation distortion on QTL mapping in F2 populations. Theoretical and Applied Genetics, 121, 6: 1071–1082
- Zhu J., Alvarez S., Marsh E. L., Lenoble M. E., Cho I.-J., Sivaguru M., Chen S., Nguyen H. T., Wu Y., Schachtman D. P., Sharp R. E. 2007. Cell wall proteome in the maize primary root elongation zone. II. region-specific changes in water soluble and lightly ionically bound proteins under water deficit. Plant Physiology, 145, 4: 1533–1548

Zupin M., Maras M., Meglič V. 2014. Development of genetic map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) for quantitative trait loci detection involved in response to drought. V: *Proceedings*, 4th Colloquium of Genetics, Piran, September 19th, 2014. Ramšak A., Potočnik U. (ur.). Genetic Society of Slovenia, Ljubljana, str. 45

Zupin M., Sedlar A., Kidrič M., Meglič V. 2017. Drought-induced expression of aquaporin genes in leaves of two common bean cultivars differing in tolerance to drought stress. *Journal of Plant Research*, 1, doi: 10.1007/s10265-017-0920-x: 10 str.

ZAHVALA

Najprej bi se rada zahvalila mentorju, izr. prof. dr. Vladimirju Megliču, za vodenje, usmerjanje, za pomoč pri organizaciji dela ter za vse konstruktivne predloge, ki so me pripeljali do zaključka tega dela. Za financiranje se zahvaljujem Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije.

Hvala članom komisije izr. prof. dr. Jerneju Jakšetu, izr. prof. dr. Dominiku Vodniku in izr. prof. dr. Jelki Šuštar-Vozlič za pregled doktorske naloge, hitro odzivnost, dostopnost in pripravljenost. Posebej bi se zahvalila dr. Jelki Šuštar-Vozlič za pomoč pri raziskovalnem delu, tako pri poskusih v rastni komori in rastlinjaku, kot tudi pri pisanju različnih predstavitev in poročil. Hvala tudi dr. Dominiku Vodniku za pomoč pri fizioloških meritvah v poskusih na rastlinah navadnega fižola in za pomoč pri interpretaciji podatkov.

Iskrena hvala dr. Marjetki Kidrič za ves čas in trud, ki je bil vložen v raziskovalno delo doktorske disertacije. Od zasnove in postavitve poskusa z rastlinami, do izvajanja meritev in vzorčenja ter strokovnega sodelovanja pri pisanju članka ter nenazadnje doktorske disertacije ste bili ob meni, mi nudili strokovno podporo, nasvete in znanje za kar sem vam res iz srca hvaležna.

Najlepša hvala dr. Petri Kozjak, ki je z mano prehodila prve korake tega raziskovalnega dela na Kmetijskem inštitutu Slovenije, me vpeljala v samostojno laboratorijsko delo in mi z vodenjem ter nasveti odlično predstavila delo uspešne raziskovalke. Hvala tudi za vse narejene analize identifikacije akvaporinov pri navadnem fižolu in za analize ISSR, RAPD, SRAP-RGA, RGAP, SRAP ter delno specifičnih markerjev, katerih podatke smo uporabili v nadaljnjih analizah.

Za pomoč pri meritvah in vzorčenju rastlin ter pri laboratorijskih analizah in pisanju članka bi se iskreno zahvalila tudi dr. Markotu Marasu in dr. Alešu Sedlarju ter dr. Barbari Pipan za izolacijo DNA rekombinantnih inbridiranih linij. Zahvala gre tudi vsem ostalim sodelavcem iz Oddelka za poljedelstvo, vrtnarstvo, genetiko in žlahtnjenje za pomoč ter prijetne, zabavne in poučne pogovore.

Najlepša hvala sodelavcem, ki so na tej raziskovalni poti postali moji iskreni prijatelji. Hvala za roko, hvala za smeh, objem in v srce zapisane besede.

Za največjo podporo in zaupanje bi se zahvalila moji družini in prijateljem, ki mi pustijo, da sem to kar sem.

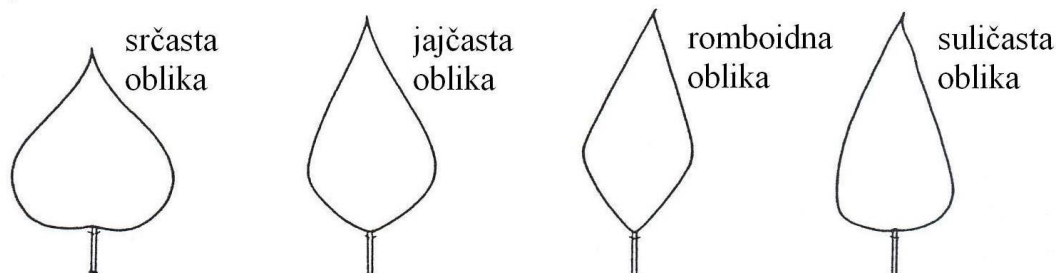
Res lepa hvala vsem!

PRILOGA A

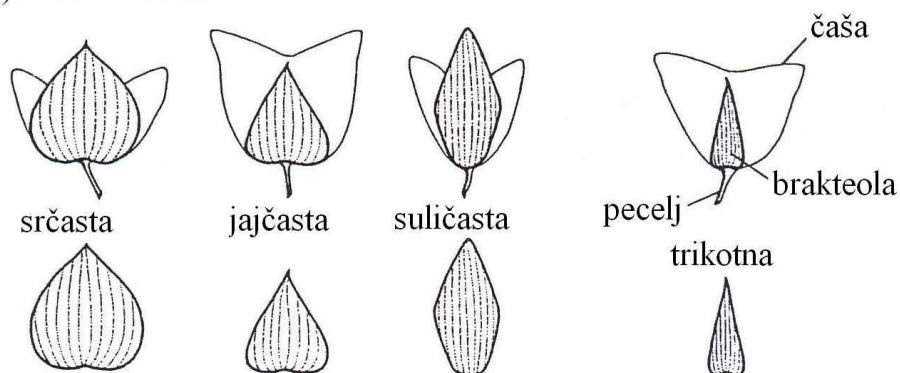
Fenotipske različice nekaterih proučevanih morfoloških znakov (Singh, 1991: 382).

Appendix A: Phenotypic versions of some of the studied morphological characters (Singh, 1991: 382).

a) LIST



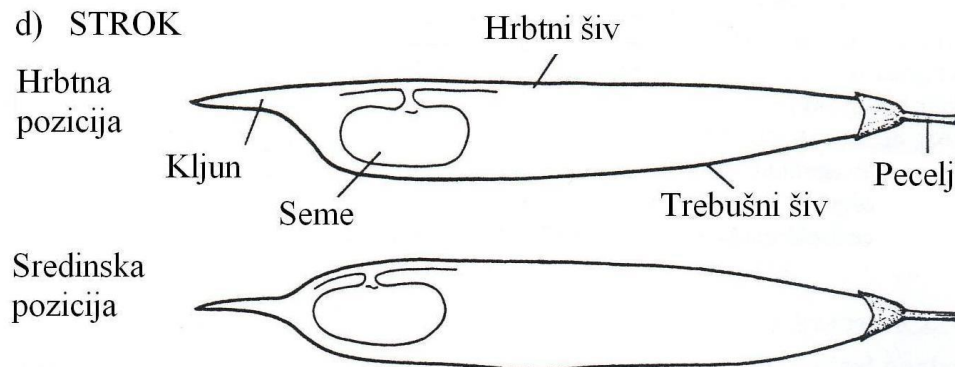
b) BRAKTEOLA



c) JADRO



d) STROK



PRILOGA B

Seznam in nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov mikrosatelitnih markerjev.

Appendix B: List and sequences of mikrosatellite primers.

Št.	Lokus	Mikrosatelitska ponovitev	F: R:	Nukleotidno zaporedje parov začetnih oligonukleotidov v smeri 5' – 3'	Tm (°C)	D (bp)	Referenca
1	ATA002	(TAA)20(GAA)10	1: 2:	CGTCTGTGTTTGCTAGTA GAGAGAGGTGAAATTGAAAG	47	129	Metais in sod. (2002)
2	ATA003	(TAA)9	1: 2:	CCGAAGACATAACTGATGAT TGAGTACGTGCTGGAACCTT	57	133	Metais in sod. (2002)
3	ATA004	(TTA)8	1: 2:	CAGATTAGTCTTTTGTTCAT GGCGTCATGAAACAAGAA	52	134	Metais in sod. (2002)
4	ATA005	(TTN)42	1: 2:	TCCGTAATTGGAACGGAACA CCGATTTTCTTTTGGTCGCT	62	191	Metais in sod. (2002)
5	ATA006	(TAT)19	1: 2:	TGATTTGTCTAACACTTCAC GGAGATGATTTGCATGTAG	57	143	Metais in sod. (2002)
6	ATA007	(ATA)11	1: 2:	ATAAATCTATTGAGTTCTAG AACAAGTCAATAATCTAAAG	48	136	Metais in sod. (2002)
7	ATA009	(AAT)12	1: 2:	AAGCCACTGTAGCTGGAAGC GCCCTTCTACTACCACTCTA	60	191	Metais in sod. (2002)
8	ATA010	(ATT)11	1: 2:	TTGTCATCCAAAGATTATTA GACAATAATAAAAAATGGTTT	48	106	Metais in sod. (2002)
9	ATA013	(TTA)68	1: 2:	ATTCATTAGCAACTCAAGC TGAGTAGAGATAAACACATA	47	263	Metais in sod. (2002)
10	ATA016	(TAA)14	1: 2:	CAAAATGGAAAGAAAATGTC TGTTTCGTAATCAAATCTTG	47	175	Metais in sod. (2002)
11	ATA022	(TAA)18	1: 2:	GAGATGATTTGCATGTAGTA TCCTTGCTTCATTGATTGT	60	152	Blair in sod. (2008)
12	ATA024	(TTA)18 (2)	1: 2:	TGAGTAATGGTTACTATTATTA GTGCACATACAAAATCATTC	60	98-134	Blair in sod. (2008)
13	ATA026	(TAA)12 (2)	1: 2:	TGAAGGACAACCTTGTTTAC GGCAACTGTTTACTGCTG	60	130-142	Blair in sod. (2008)
14	ATA027	(TTA)13 (1)	1: 2:	TGGAAGCCTATTATAACAATGA GAAGAAGAATAATAGTACGCCG	60	130	Blair in sod. (2008)
15	ATA030	(TAT)37 (16)	1: 2:	AAGCCTATTATAACAATGAA GATCATGAGTATAATAAGAA	55	202	Blair in sod. (2008)
16	ATA032	(TAA)9	1: 2:	CACCATTTCACGTTTGAG CAAAGTATTTGACGACACC	55	105	Blair in sod. (2008)
17	ATA069	(TTA)24 (2)	1: 2:	TATATAATATTTACATTCGG CAATAGAAAAACTCCTATAG			Blair in sod. (2008)
18	ATA071	(ATT)10	1: 2:	TTCAATTGACTTGAAGGTCAGG AATAACCCCAAACCTGAGATAAA	57	193	Blair in sod. (2008)
19	ATA073	(TTA)11	1: 2:	ATATTATTTATACAAATTTCAAA G ATCGAGATCTAGAGAGAAGG	47	97	Blair in sod. (2008)
20	ATA074	(TTA)7	1: 2:	AAT TAT TAG CAA AAA TAG AGG TG TGC TAA ATT TCT ATC GTC TGA GT	52	145	Blair in sod. (2008)
21	ATA076	(TAA)12 (N)29 (TA)8	1: 2:	GAT CTA ATT TTT TGC TTC TT TGC TAT TAT ATT CCT TTT CA	50	198	Blair in sod. (2008)
22	ATA077	(TAA)12	1: 2:	CCA GGA TTT GTA AAA TCA TCA T TGT TTC TAG ATT TCT GGA TCT G	57	186	Blair in sod. (2008)

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge B.

Št.	Lokus	Mikrosatelitska ponovitev	F: R:	Nukleotidno zaporedje parov začetnih oligonukleotidov v smeri 5' – 3'	Tm (°C)	D (bp)	Referenca
23	ATA090	(TTA)8	1:	GAG ATG ATT TGC ATG TAG TA	50	121	Blair in sod. (2008)
			2:	TCC TTG CTT CAT TGA TTT GT			
24	ATA108	(TTA)15	1:	CAA TGT TGG TAT TTT ATT TT	52	125	Blair in sod. (2008)
			2:	ACA AAA ACC ACA CAT TAT TA			
25	ATA112	(ATA)8	1:	TTA TAA AAC GGA TCA TTC TG	53	258	Blair in sod. (2008)
			2:	CCA TTC TTC ACT CAA ATA AT			
26	ATA113	(TAA)7	1:	GGT CTC TAT TTT AGT TTC TAT TG	52	176	Blair in sod. (2008)
			2:	CTC CAT TAC ATA TTT ACT TTA CC			
27	ATA116	(TAA)12	1:	CAA ATT GAC AGG TCC AAA AT	56	118-	Blair in sod. (2008)
			2:	CAT GAT TAC GAA TTC GAG CT		145	
28	ATA121	(ATA)9	1:	TCA ACA TCA CAT GTA AAA GTC A	58	91	Blair in sod. (2008)
			2:	GAA AGT TTC CTC TTC CAG CTC C			
29	ATA133	(TAT)9	1:	TTT GTC ATA TTA TCG AAT TT	51	182	Blair in sod. (2008)
			2:	TAA TCC GTA TAT AAT TTT GG			
30	ATA138	(TTA)13	1:	ACA ATT GAA ATT TAT TTT CC	52	154	Blair in sod. (2008)
			2:	GGT ATA CTG AAA CAG GTT GT			
31	ATA143	(ATT)15	1:	AAA TCT TAG TGA GTT ATT TAT T	44	150-	Blair in sod. (2008)
			2:	AAA TAT AGT GAT TGA TTG AGA G		172	
32	ATA145	(TTA)20 (4)	1:	ATG TGT CAT TTA GTA GAC TAA G	49	138-	Blair in sod. (2008)
			2:	TAT CTC CTG ATA TAT TGA ATT G		160	
33	ATA150	(TAT)11	1:	AGA GAG AAA AAA TGA AGA GA	50	180-	Blair in sod. (2008)
			2:	CGT CCT CAT AAA CAA TAA TA		210	
34	ATA157	(ATA)11	1:	TTG ACA GGA TTC ATG ACT GA	58	130	Blair in sod. (2008)
			2:	CAA TGG TCA TTT ACA AAG CA			
35	ATA170	(TAA)15 (1)	1:	CTG AGA TAA TTT GTA ATA AT	44	122-	Blair in sod. (2008)
			2:	TTA TAA ATT TTA TAC GTA AC		158	
36	ATA172	(TTA)24 (5)	1:	ACG AAA AAC GAT AAA TAA GA	48	142-	Blair in sod. (2008)
			2:	AAA AGG GTT ACC ATA GAA GT		160	
37	ATA173	(TTA)7	1:	TAA TTC TAA TAC ATC ATG CG	51	168-	Blair in sod. (2008)
			2:	AAT ACA TTG TAT CAT AAC CG		170	
38	ATA175	(ATT)7	1:	CCC CCC AGA ATT TAC TTT AT	58	114-	Blair in sod. (2008)
			2:	TCC AGC AAA GGA AGG ATA TT		130	
39	ATA180	(TAA)11	1:	ATT ATT TTA TCA TGG ATG AA	49	212-	Blair in sod. (2008)
			2:	AAA TTT CAA AAG AAA AAT AC		250	
40	ATA209	(TAA)16 (3)	1:	CAT AGT AAC TTT GTT GTC CA	48	230-	Blair in sod. (2008)
			2:	TGA ACA TTG TTT TCT TCT AA		243	
41	ATA220	(TTA)6(TAT)4 (ATT)5	1:	CTT TAT ATA AAG AAG ATA TA	39	76-	Blair in sod. (2008)
			2:	ATG AGA TAA TTA TAA TAA TA		119	
42	ATA226	(TAT)9	1:	CAT GCC GCA CAC ATT ATA TT	60	158-	Blair in sod. (2008)
			2:	TTT TTT CCA ATT CTG TGC TG		175	
43	ATA234	(TAA)7	1:	TTT TTC TTA GAA AGT GGC GT	58	188-	Blair in sod. (2008)
			2:	AGT AAG GCA AAG TTT TTG GC		234	

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge B.

Št.	Lokus	Mikrosatelitska ponovitev	F: R:	Nukleotidno zaporedje parov začetnih oligonukleotidov v smeri 5' – 3'	Tm (°C)	D (bp)	Referenca
44	ATA236	(TTA)8	1: 2:	AGA ATT CAG TTT CAT GCC TC CCA AGG AAA ATG AAA AAG TC	58	200- 232	Blair in sod. (2008)
45	ATA241	(TTA)17	1: 2:	ATT GAT TTG CGA ACA CTC AC ATG CAT GAT TAC GAA TTC GA	60	128- 200	Blair in sod. (2008)
46	ATA243	(TAT)8	1: 2:	ACT ATA TTG GGT CTC CTA AA CCA ATT CCA TAT GTA AGT TT	52	184- 219	Blair in sod. (2008)
47	ATA244	(TAT)15 (2)	1: 2:	TGG CGG TAG AAA TAT GAA AA GAG ATG GAA GAT GGG TTC AG	56	178- 220	Blair in sod. (2008)
48	ATA247	(TAT)15 (1)	1: 2:	AAA CAA TGC ATA AAA AGT CC AGA GTT TAT TGG ATT AAG CG	55	158- 188	Blair in sod. (2008)
49	ATA248	(TAA)15 (3)	1: 2:	GAG AGT ATG GGT GTG TGC TG CCT CCT CCT CAC CAC TCT AA	56	124- 138	Blair in sod. (2008)
50	ATA268	(TA)9(ATA)15 (ATG)8	1: 2:	AAA AGA AAA ACA ATT ATT GC CAT ACA CAA ACA TGT CTT CA	52	148- 195	Blair in sod. (2008)
51	ATA269	(TTA)11	1: 2:	AAC AGG AAA ATA TCA TCT TA GAA TAA ATC TAT TGG AGT TC	49	102- 132	Blair in sod. (2008)
52	ATA288	(TTA)16 (3)	1: 2:	ATA AAA TTT ATA ATG GAT GG GGG AAT CCT CTT TAT ATA TA	49	174- 208	Blair in sod. (2008)
53	ATA289	(TAT)2(AAT)1 2	1: 2:	GGA TGT ATT GCC CAA AAT TA TTG GGG CAC TTA TAA TTT GA	56	235- 265	Blair in sod. (2008)
54	ATA296	(TTA)11	1: 2:	TTT CAT ATT TTT CCA CGA CC TAA CCC TTT CTT TAC CCC TT	58	135- 175	Blair in sod. (2008)
55	BM003	(GAA)3GATG AA(GCA)2 (GAA)4	1: 2:	CAGAAGTGCTTATCCCCGAG TGAAATCTTCCCCTCCTTCA	60	193	Gaitan-Solis in sod. (2002)
56	BM006	(GAAAA)3	1: 2:	AGGGTTTACACACGACAGGC GGTTGATATGCCCTCATGGT	60	153	Gaitan-Solis in sod. (2002)
57	BM016	(CA)21TA(CA) 5	1: 2:	CACCGGGAGTGGCTGACA GTTTGGGGCGGAGTTCGA	60	149	Gaitan-Solis in sod. (2002)
58	BM020	(CAGA)3GAC A(CAGA)1 2	1: 2:	ATCCGTAGAGAGGTGAACGG ATGAGTGCAGTTTGGTGCAG	52	146	Gaitan-Solis in sod. (2002)
59	BM025	(CA)17CG(CA) 21	1: 2:	CGCCTCCAACGGTCTTCT CAAGCAGGTGCGAATCCA	52	227	Gaitan-Solis in sod. (2002)
60	BM048	(GA)5	1: 2:	GCCGTTGAGCTGGAGAGCA CCTTCTTCTTGAGCCCGCTG	60	232	Gaitan-Solis in sod. (2002)
61	BM053	(CT)21(CA)19(TA)9	1: 2:	AACTAACCTCATACGACATGAAA AATGCTTGCACTAGGGAGTT		287	Gaitan-Solis in sod. (2002)
62	BM067	(CA)31(CG)5(CA)10	1: 2:	CCAATGCTGCCACACAGATA CGCCCTTATGATCCAGTCCT	45	289	Gaitan-Solis in sod. (2002)
63	BM068	(CA)6TA(CA) 4(TA)4(CA) 5	1: 2:	TTCGTTCAACCTCTTGCATT TGCTTGTATCTTGCCCACTG	60	170	Gaitan-Solis in sod. (2002)
64	BM079B	(GA)28	1: 2:	CATGGAGGTAGAGGATAATAAG GAG CATTAGAGCCGCCACTTG	47	125	Gaitan-Solis in sod. (2002)

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge B.

Št.	Lokus	Mikrosatelitska ponovitev	F: R:	Nukleotidno zaporedje parov začetnih oligonukleotidov v smeri 5' – 3'	Tm (°C)	D (bp)	Referenca
65	BM098	(CA)8(CT)3	1: 2:	GCATCACAAAGGACTGAGAGC CCCAAGCAAAGAGTCGATTT	60	247	Gaitan-Solis in sod. (2002)
66	BM114	(TA)8(GT)10	1: 2:	AGCCTGGTGAAATGCTCATAG CATGCTTGTTGCTAACTCTCT	45	234	Gaitan-Solis in sod. (2002)
67	BM137	(CT)33	1: 2:	CCGTATCCGAGCACCCTAAC CGCTTACTCACTGTACGCACG		155	Gaitan-Solis in sod. (2002)
68	BM138	(GT)13	1: 2:	TGTCCCTAAGAACGAATATGGAA TC GAATCAAGCAACCTTGGATCATA AC	45	203	Gaitan-Solis in sod. (2002)
69	BM139	(CT)25	1: 2:	TTAGCAATACCGCCATGAGAG ACTGTAGCTCAAACAGGGCAC	45	115- 118	Gaitan-Solis in sod. (2002)
70	BM140	(GA)30	1: 2:	TGCACAACACACATTTAGTGAC CCTACCAAGATTGATTTATGGG	60	190	Gaitan-Solis in sod. (2002)
71	BM141	(GA)29	1: 2:	TGAGGAGGAACAATGGTGGC CTCACAAACCACAACGCACC		218	Gaitan-Solis in sod. (2002)
72	BM142	(GA)10A(GA)15	1: 2:	TTCCGCTGATTGGATATTAGAG AGCCCGTTCCTTCGTTTAG	60	157	Gaitan-Solis in sod. (2002)
73	BM143	(GA)35	1: 2:	GGGAAATGAACAGAGGAAA ATGTTGGGAACTTTTAGTGTG		143	Gaitan-Solis in sod. (2002)
74	BM146	(CTGTTG)4-(CTG)4-(TTG)3(CTG)3-(CTG)4	1: 2:	GAGATGAGTCCTTTCCCTACCC TGCAGACACAATTTATGAAGGC	60	281	Gaitan-Solis in sod. (2002)
75	BM147	(CGA)4	1: 2:	GGAACCAACAAGTTCCACTTAG GAGACTGTGCTTTCGGACTC	60	178	Gaitan-Solis in sod. (2002)
76	BM148	(CAG)5-(CAA)5-CAT(CAA)3CAT(CAA)3	1: 2:	TTGAAACTCTCTTTGCAGACAC AACTAATCCATTTGCACTACCC	60	295	Gaitan-Solis in sod. (2002)
77	BM149	(TGC)6(TAG)3	1: 2:	CGATGGATGGATGGTTGCAG GGGCCGACAAGTTACATCAAATT C	60	273	Gaitan-Solis in sod. (2002)
78	BM150	(TA)6(TG)19	1: 2:	CGAACTATTTGATACTCATGTGC TTGCAGGACAGATAAGTTAGAAG A	55	196	Gaitan-Solis in sod. (2002)
79	BM151	(TC)14	1: 2:	CACAACAAGAAAGACCTCCT TTATGTATTAGACCACATTACTTC C	56	153	Gaitan-Solis in sod. (2002)
80	BM152	(GA)31	1: 2:	AAGAGGAGGTGAAACCTTAAA TCG CCGGGACTTGCCAGAAGAAC	60	127	Gaitan-Solis in sod. (2002)
81	BM153	(CA)5(TG)(CA)3CG(CA)10(TA)4	1: 2:	CCGTTAGGGAGTTGTTGAGG TGACAAACCATGAATATGCTAAG A	57	226	Gaitan-Solis in sod. (2002)

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge B.

Št.	Lokus	Mikrosatelitska ponovitev	F: R:	Nukleotidno zaporedje parov začetnih oligonukleotidov v smeri 5' – 3'	Tm (°C)	D (bp)	Referenca
82	BM154	(CT)17	1: 2:	TCTTGCGACCGAGCTTCTCC CTGAATCTGAGGAACGATGACCA G	64	218	Gaitan-Solis in sod. (2002)
83	BM155	(CA)8	1: 2:	GTTTCATGTTTGTGTTGACAGTTCA CAGAAGTTAGTGTGGTTTGATA CA	60	114	Gaitan-Solis in sod. (2002)
84	BM156	(CT)32	1: 2:	CTTGTTCCACCTCCCATCATAGC TGCTTGCATCTCAGCCAGAATC	64	267	Gaitan-Solis in sod. (2002)
85	BM157	(GA)16	1: 2:	ACTTAACAAGGAATAGCCACACA GTTAATTGTTTCCAATATCAACCT G	56	113	Gaitan-Solis in sod. (2002)
86	BM158	(CT)22	1: 2:	CCGAGCACCGTAACTGAATGC CGCTCGCTTACTCACTGTACGC	64	130	Gaitan-Solis in sod. (2002)
87	BM159	(CT)9(CA)8	1: 2:	GGTGCTGTTGCTGCTGTTAT GGGAGATGTGGTAAGATAATGA AA	60	198	Gaitan-Solis in sod. (2002)
88	BM160	(GA)15(GAA) 5	1: 2:	CGTGCTTGCGAATAGCTTTG CGCGGTTCTGATCGTGAATTC	64	211	Gaitan-Solis in sod. (2002)
89	BM161	(GA)7(GA)8	1: 2:	TGCAAAGGGTTGAAAGTTGAGA G TTCCAATGCACCAGACATTCC	60	185	Gaitan-Solis in sod. (2002)
90	BM164	(GT)9(GA)21	1: 2:	CCACCACAAGGAGAAGCAAC ACCATTCAGGCCGATACTCC	60	182	Gaitan-Solis in sod. (2002)
91	BM165	(TA)3(CA)9	1: 2:	TCAAATCCCACACATGATCG TTCTTTTCATTCATATTATTCGGTT CA	60	177	Gaitan-Solis in sod. (2002)
92	BM166	(CA)3T(CA)7	1: 2:	AAAGTGGGAGAGAAACACTACA CC GATGCTGGCTTTCCATTGAG	60	151	Gaitan-Solis in sod. (2002)
93	BM167	(GA)19	1: 2:	TCCTCAATACTACATCGTGTGAC C CCTGGTGTAAACCCTCGTAACAG	64	165	Gaitan-Solis in sod. (2002)
94	BM170	(CT)5CCTT(C T)12	1: 2:	AGCCAGGTGCAAGACCTTAG AGATAGGGAGCTGGTGGTAGC	57	179	Gaitan-Solis in sod. (2002)
95	BM171	(GA)13	1: 2:	TGGCATTTCAGATTAACACTCC CTTCCTTGCTGTTTCCACTG	57	149	Gaitan-Solis in sod. (2002)
96	BM172	(GA)23	1: 2:	CTGTAGCTCAAACAGGGCACT GCAATACCGCCATGAGAGAT	60	107	Gaitan-Solis in sod. (2002)
97	BM173	(GT)16(GA)30	1: 2:	ATGCGTAAGCGAGGGAGAG CCAGTATATAACGCTGCTGCTG	45	185	Gaitan-Solis in sod. (2002)
98	BM175	(AT)5(GA)19	1: 2:	CAACAGTTAAAGGTCGTCAAATT CCACTCTTAGCATCAACTGGA	56	170	Gaitan-Solis in sod. (2002)
99	BM181	(CT)17	1: 2:	ATGCTGCGAGTTAATGATCG TGAGGAGCAAACAGATGAGG	60	192	Gaitan-Solis in sod. (2002)

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge B.

Št.	Lokus	Mikrosatelitska ponovitev	F: R:	Nukleotidno zaporedje parov začetnih oligonukleotidov v smeri 5' – 3'	Tm (°C)	D (bp)	Referenca
100	BM183	(TC)14	1: 2:	CTCAAATCTATTCACTGGTCAGC TCTTACAGCCTTGCAGACATC	57	149	Gaitan-Solis in sod. (2002)
101	BM184	(AC)11	1: 2:	AGTGCTCTATCAAGATGTGTG ACATAATCAATGGGTCAGT	56	160	Gaitan-Solis in sod. (2002)
102	BM185	(CT)12	1: 2:	AAGGAGGTTTCTACCTAATTCC AAAGCAGGGATGTAGTTGC	60	105	Gaitan-Solis in sod. (2002)
103	BM187	(CT)10T(CT)14	1: 2:	TTTCTCCAACCTCACTCCTTTCC TGTGTTTGTGTTCCGAATTATGA	58	191	Gaitan-Solis in sod. (2002)
104	BM188	(CA)18(TA)7	1: 2:	TCGCCCTTGAACTTCTTGTATC CCCTTCCAGTTAAATCAGTCG	57	177	Gaitan-Solis in sod. (2002)
105	BM189	(CT)13	1: 2:	CTCCCACTCTCACCCCTCACT GCGCCAAGTGAACTAAGTAGA	60	114	Gaitan-Solis in sod. (2002)
106	BM195	(GA)23	1: 2:	ACTGTAGCTCAAACAGGGCACT TCCGAGCACCGTAACTGAAT	59	138	Gaitan-Solis in sod. (2002)
107	BM197	(GT)8	1: 2:	TGGACTGGTCGATACGAAGC CCCAGAAGATTGAGAACCAC	59	201	Gaitan-Solis in sod. (2002)
108	BM199	(GA)15	1: 2:	AAGGAGAATCAGAGAAGCCAAA AG TGAGGAATGGATGTAGCTCAGG	59	304	Gaitan-Solis in sod. (2002)
109	BM200	(AG)10	1: 2:	TGGTGTTTGTATGGGAGAAG ATTTGTCTCTGTCTATTCTTCCA C	60	221	Gaitan-Solis in sod. (2002)
110	BM201	(GA)15	1: 2:	TGGTGCTACAGACTTGATGG TGTCACCTCTCTCCTCCAAT	57	102	Gaitan-Solis in sod. (2002)
111	BM202	(GA)9GT(GA)4	1: 2:	ATGCGAAAGAGGAACAATCG CCTTTACCCACACGCCTTC	59	156	Gaitan-Solis in sod. (2002)
112	BM205	(GT)11	1: 2:	CTAGACCAGGCAAAGCAAGC TGAGCTGGGATTTCAATTCTG	59	137	Gaitan-Solis in sod. (2002)
113	BM209	(TA)4(TG)16	1: 2:	CAACCAATGAATGCTGACAATG CAATTTCTTGATTGAAAGGCAAT		129	Gaitan-Solis in sod. (2002)
114	BM210	(CT)15	1: 2:	ACCACTGCAATCCTCATCTTTG CCCTCATCTCCATTCTTATCG	60	166	Gaitan-Solis in sod. (2002)
115	BM211	(CT)16	1: 2:	ATACCCACATGCACAAGTTTGG CCACCATGTGCTCATGAAGAT	60	186	Gaitan-Solis in sod. (2002)
116	BM212	(CA)13	1: 2:	AGGAAGGGATCCAAAGTCACTC TGAACTTTCAGGTATTGATGAAT GAAG	59	214	Gaitan-Solis in sod. (2002)
117	BM213	(CTT)4(CT)5(CTT)(CT)(CTT)(CT)4	1: 2:	AACCCTAAGCTTCACGCATTTG GAGAGATTGACGACGGTTT	55	154	Gaitan-Solis in sod. (2002)

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge B.

Št.	Lokus	Mikrosatelitska ponovitev	F: R:	Nukleotidno zaporedje parov začetnih oligonukleotidov v smeri 5' – 3'	Tm (°C)	D (bp)	Referenca
118	BM214	(TAA)4	1: 2:	TTTGACAAAGCAGCTCCAG AATTAGAACCTCCTTTAGATACC AA	57	294	Blair in sod. (2009b)
119	BM215	(TCG)4	1: 2:	TCTCCTCGCGCCGTTT CAAGAGACCCAGACCCAGAC	60	187	Blair in sod. (2009b)
120	BM216	(GT)6	1: 2:	GTGGTACGCCAAACCTTCG ACCACCACACTTCCACCAAT	60	148	Blair in sod. (2009b)
121	BM217	(GT)5	1: 2:	GCGTATGGCACTCTGAAGGT GCCCCGTGCTTGAGGATTAC	60	111	Blair in sod. (2009b)
122	BM218	(GA)15	1: 2:	GAGTGGGGAACGAAGCATAA GAAGTGCATTGCTGAGGTGA	60	103	Blair in sod. (2009b)
123	BM219	(TG)2(TA)2(TG)6	1: 2:	GCGTATGGCACTCTGAAGGT GCCCCGTGCTTGAGGATTAC	60	111	Blair in sod. (2009b)
124	BM220	(GA)4(CA)3(CA)3	1: 2:	AGTGACGAACAAGGGACTGG TCAAGTCAGCCAGCAAGAAA	60	150	Blair in sod. (2009b)
125	BM221	(CT)21(CT)3	1: 2:	CCCCTCAGGTTTGGACTCTT GGAATGAGAGAGAAAGCATGG	57	149	Blair in sod. (2009b)
126	BM222	(CT)4	1: 2:	CCCCTCAGGTTTGGACTCTT GAGGCTGTTGTAGGAATTGG	57	249	Blair in sod. (2009b)
127	BM223	(TA)4(TA)7	1: 2:	TTTGGGTCGTTTACCAGTATCA TTTATGCCAAAGAGTCATTTCAA	57	167	Blair in sod. (2009b)
128	BM224	(GGT)3(GGA)3	1: 2:	GAGGACCAAACACCGGAAC CCTCCAGGACAGATGGTGAG	60	121	Blair in sod. (2009b)
129	BM225	(GCT)5(GAG)2	1: 2:	GAGCCTGGAAGGAAAAGAAGA CGCGCAATTAACCTCACTA	60	169	Blair in sod. (2009b)
130	BM226	(GGT)4(GGC)2	1: 2:	GGGTGTGAGCGTGTTCATC ACTTCTCGTCAATCCCAACG	60	156	Blair in sod. (2009b)
131	BM227	(CTG)5	1: 2:	CTGTTCACCCAAACCTGA GTTCCGCAATGCTACCTACG	60	122	Blair in sod. (2009b)
132	BM228	(AG)4(CA)4	1: 2:	GTTATGCCCAGAAGCAGAGG GCCCCCAAATGAGAAACCTA	60	120	Blair in sod. (2009b)
133	BM229	(CA)5	1: 2:	TGCCCCGTGCTTTAGGATTAC AAAAATCTGTTCACCCAGGA	57	138	Blair in sod. (2009b)
134	BM230	(GT)7	1: 2:	GCGTATGGCACTCTGAAGGT TAGTTGCTTGCTCGTGCTTC	57	121	Blair in sod. (2009b)
135	BM231	(CA)5(TA)2(CA)2	1: 2:	TGCCCCGTGCTTTAGGATTAG TGTTACCCACGGTATCTGA	60	135	Blair in sod. (2009b)
136	BM232	(AC)3(CA)4	1: 2:	TGCAGAAGATGGACCAAAGA GCAAAACATATCGTGCAAGTG	57	112	Blair in sod. (2009b)
137	BM233	(CA)5(CCA)2	1: 2:	AACCAGTTGCCTGTCCAACA AGGAAGGACGGCTTTATGCT	57	177	Blair in sod. (2009b)
138	BM234	(GCTT)5	1: 2:	CACCGAATCCGAGAGAACTG AGTGTTCCTTCCGGGCTTC	60	146	Blair in sod. (2009b)
139	BM235	(GCA)4(GCA)4	1: 2:	GAGTGTTCACCGTCGAGA GGTCCTTGCTTGGTGATAGG	60	145	Blair in sod. (2009b)
140	BM236	(GA)25	1: 2:	GCTGAAAAGAGGAGGTGCAA GGACTTGCCAGAAGAAGTGC	60	130	Blair in sod. (2009b)

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge B.

Št.	Lokus	Mikrosatelitska ponovitev	F: R:	Nukleotidno zaporedje parov začetnih oligonukleotidov v smeri 5' – 3'	Tm (°C)	D (bp)	Referenca
141	BM237	(GA)26	1:	CTGCAGCTCAAACAGGGC	60	113	Blair in sod. (2009b)
			2:	GCAATACCGCCATGAGAGAT			
142	BM238	(GA)14	1:	GGTCCCTGATTGAAAACTAAA	55	150	Blair in sod. (2009b)
			2:	GCAAAACTTTTAGCAATCTTACA			
143	BM239	(TC)12	1:	CTGCTACTACTCCCACTACTTCA	55	113	Blair in sod. (2009b)
			2:	ATGTAAGCCATTCCTCTTC			
144	BM240	(CCA)7	1:	CAGCAGAAACAGCAGCAGAA	60	138	Blair in sod. (2009b)
			2:	ATGGAGAGGGTAGCCGATGT			
145	BM241	(TG)6	1:	TGGCACTCTGAAGGTGGTAA	60	147	Blair in sod. (2009b)
			2:	TGGAACCTTGGACAAATTGAG			
146	BM242	(TG)2(TG)5	1:	TCAAGTCAGCCAGCAAGAAA	60	226	Blair in sod. (2009b)
			2:	GCTGAGAATGTTGGGAACG			
147	BM243	(TA)5	1:	TGTTCTATTTTCTGACTCCCTCTC	58	218	Blair in sod. (2009b)
			2:	TGTCGACAAAGCAATCAGAC			
148	BM244	(TG)6	1:	GCGTATGGCACTCTGAAGGT	58	119	Blair in sod. (2009b)
			2:	TAGTTGCTTGCTCGTGCTTC			
149	BM245	(CCA)5(CCA) 2	1:	ACCCCAAACAGTACCAACCA	60	186	Blair in sod. (2009b)
			2:	CCACCATATCCAAGCCTGTC			
150	BM246	(CA)5(CA)2	1:	AGAAACGCTTTGGTTGCTTG	58	122	Blair in sod. (2009b)
			2:	TGGCACTCTGAAGGTGGTAA			
151	BM247	(TTA)5	1:	CCAACCTCTAAAGCGCGTGT	58	126	Blair in sod. (2009b)
			2:	CACGGTATGCGTTTGGACTA			
152	BM248	(TG)5	1:	ATTCACCTCCGTCTCTGAGC	58	129	Blair in sod. (2009b)
			2:	TCGTGCTTCAAGGTCACGTA			
153	BM249	(TC)4(TC)5	1:	CACGAACCTTCATTCACCTTC	58	159	Blair in sod. (2009b)
			2:	TCTCGGCCATAGGAGTTACC			
154	BM250	(CA)6	1:	TTCTTCATCCGACCCAACTC	58	165	Blair in sod. (2009b)
			2:	TGTGTTAGATTCTGGGAGTTTCA			
155	BM251	(TAA)7(TTA)4	1:	AACATTTCCAGCCGAATCAT	58	199	Blair in sod. (2009b)
			2:	TTCAGGAACGATCTCCTTTG			
156	BM252	(CT)7(CT)4	1:	CTGGGCGTAGTCCAAGTTGT	58	110	Blair in sod. (2009b)
			2:	GGTACCTGCAAAAATATCAAGC			
157	BM253	(CT)5	1:	GGAATCATTCAACCCATAAG	58	150	Blair in sod. (2009b)
			2:	ATTCCGCGAAGAAAATAAGG			
158	BMb0002		1:	AATGTCTTTCCGACACATTC	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	GACCAATTGATTTAGTTCGG			
159	BMb0004		1:	TTGAGCATGCTTGCTAGTG	53		Cordoba in sod. (2012)
			2:	TTGCATGATATTGATGATCC			
160	BMb0010		1:	GAGGCAATTCGTTTGAAATA	49		Cordoba in sod. (2012)
			2:	AGACAATCCGTTATACAATCT			
161	BMb0032		1:	CTGACCTCGATCTTTCTGAG	54		Cordoba in sod. (2012)
			2:	GAACCATCCAGTTAAACCAA			
162	BMb0057		1:	CAAAGCTTGAACACACTTGA	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	TTACATAGTGGACGGGATTC			
163	BMb0064		1:	GGTGTGGCGATATAAAGTC	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	TATAATGGAACCCATAACGG			

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge B.

Št.	Lokus	Mikrosatelitska ponovitev	F: R:	Nukleotidno zaporedje parov začetnih oligonukleotidov v smeri 5' – 3'	Tm (°C)	D (bp)	Referenca
164	BMb0066		1:	AACACAATCCCAATGTTACC	51		Cordoba in sod. (2012)
			2:	AATAATTTCATGATTCCCTCGG			
165	BMb0083		1:	CCAATTGGCGAATACTTTAC	51		Cordoba in sod. (2012)
			2:	AATACTCATATGCAATAGTCAAAA			
166	BMb0096		1:	CATAAAGCACGTCACCTTCAA	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	GCCTTGGACACTACCATT			
167	BMb0133		1:	ACCTCTGAGGGAGAAGATGT	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	GATAAATGTGTGAATGCCCT			
168	BMb0152		1:	ACGCAGAGAAATCTCCAATA	46		Cordoba in sod. (2012)
			2:	CCTTCCATGATTTGTTGTTT			
169	BMb0160		1:	TATGCTGACCTTGGAACCTT	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	GGTAAACTGCAATTGGTCTC			
170	BMb0182		1:	AAATTCCAACCTCTGTGCTA	46		Cordoba in sod. (2012)
			2:	TTTGGCTGTGATTCTTCTTT			
171	BMb0185		1:	GACATTGGCTCAGTTTCATT	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	TCATCATCATCTGTTACATCAA			
172	BMb0191		1:	GCTCTGACTCTGGTGTTGAT	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	TTCCAAAGACAGTTCAGGTT			
173	BMb0247		1:	ATCCTAGGGAGTCATGAAGG	54		Cordoba in sod. (2012)
			2:	AGAATTGTAACCACACCGAC			
174	BMb0250		1:	TTGGTGGAGGAGAGATTAGA	51		Cordoba in sod. (2012)
			2:	TGTTTATCATGTTGGAATCCT			
175	BMb0256		1:	CTCCGCACTTACTTAACCAC	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	GGCATGGTCTTCTTTAGTTG			
176	BMb0264		1:	TGTACGTATGTTTGCAATGG	45		Cordoba in sod. (2012)
			2:	TGATCAAAGGAATCAACAAA			
177	BMb0266		1:	AAATTCAAACCAGCCATTC	45		Cordoba in sod. (2012)
			2:	GGCAATTACATTTGGAGAAA			
178	BMb0267		1:	TGAGCATCCTCTACTTGGTT	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	AATCTCGCCTCTCTCTCTTT			
179	BMb0277		1:	GTAGGTCAACTCGGCTATTG	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	GCTTTATGCACACGTTTATTC			
180	BMb0279		1:	TCGTGTTAACCTTGCAATAA	46		Cordoba in sod. (2012)
			2:	AAACGGTTATAAGGAGAATC			
181	BMb0290		1:	TGGTTGGATTTGGAATTTAT	45		Cordoba in sod. (2012)
			2:	AACATTAGGCAAGAAACCAA			
182	BMb0293		1:	CAATTCTACACTTTGGTGGG	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	AACGTCATTGATTTGACTCC			
183	BMb0302		1:	TTTGGATGATGTTTGATTATTG	46		Cordoba in sod. (2012)
			2:	ATTAATCCGTGGGTGTTAGA			
184	BMb0310		1:	TTTGAATTGATAAGGATAAGTTG	51		Cordoba in sod. (2012)
			2:	TGTACGCGTGTTTGAGTAAG			
185	BMb0318		1:	AAGCTTGATCTTTGATGGAA	46		Cordoba in sod. (2012)
			2:	GCTTAACAATTGAGAGGTTGA			
186	BMb0339		1:	CGCCATAGTTGAAATTTAGG	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	CGTGAGCATATGTATCATTCTT			

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge B.

Št.	Lokus	Mikrosatelitska ponovitev	F: R:	Nukleotidno zaporedje parov začetnih oligonukleotidov v smeri 5' – 3'	Tm (°C)	D (bp)	Referenca
187	BMb0341		1:	CATGAAATGCATCGAAATAC	51		Cordoba in sod. (2012)
			2:	GGGAGATTGATAGGGTGAAT			
188	BMb0349		1:	TCAGTAAGAAAAGGAGGACGA	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	TCGTCCATCTTCAAGGTTAG			
189	BMb0356		1:	TCCGAATTTCTTAATTTCACTT	46		Cordoba in sod. (2012)
			2:	ATCGCGGATTTATATGTGTC			
190	BMb0362		1:	TATTCTGTCTGGGCATTCTTA	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	CCTCGCTAGAACAAATCAAAG			
191	BMb0386		1:	CCAAATAGTAGGGTGAACCA	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	ATTGGAAGAGGTGCAACTAA			
192	BMb0405		1:	TGATTCTTTCAAATTGAGCA	45		Cordoba in sod. (2012)
			2:	TGCAACCTAGCTCCTTTAAC			
193	BMb0414		1:	AACGACCATTCTGTAGAAAGA	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	GCTCACAAATACGTCGTAGG			
194	BMb0419		1:	ACAGACGTGACAACAACCTT	51		Cordoba in sod. (2012)
			2:	TCCATATTTGCATACTTTATGTT			
195	BMb0428		1:	TCGGGTAGAAATGTTTCCTTA	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	CATGCATTCTTTCTTCTTCC			
196	BMb0445		1:	CCAAGCTCTGAATCAATCAT	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	CCAAGTTAACAATTGAGCC			
197	BMb0447		1:	ATACCCTCCCTAATCTCAGC	45		Cordoba in sod. (2012)
			2:	ATGTTATTAGTGTGTTGCAATG			
198	BMb0474		1:	TTGCTGGAAGTAACCCTAA	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	TCCGTTTAATACATCCAAGG			
199	BMb0475		1:	AGCTAACCTTCATGTGGAAA	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	CCATGAAGAGAGAACTGGTG			
200	BMb0477		1:	AAAGCCAACAAGGACTTCT	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	AAAGTTTGAAATATACGTTGGG			
201	BMb0484		1:	CAGCTAAACTTTCCGATTG	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	TGACTCAAACCAACTTATGC			
202	BMb0488		1:	TTGCTTATTGTTTCCGATT	45		Cordoba in sod. (2012)
			2:	AAGCCTTGCAAAGAGTTAAA			
203	BMb0489		1:	ACAAACCTTTATTGACCAGC	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	AAATCAATATCCTTGACTGAAAG			
204	BMb0502		1:	ATTCTCAGGCAGGAAACATA	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	ACGACCCACAATCACTTAAA			
205	BMb0506		1:	GGTACTTGAGAGGGATCAGA	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	TCAGTCCACAGAAATCATCA			
206	BMb0508		1:	TTGAGACAAATGACTCACCA	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	CGTGTTCTTTTAAACAATCC			
207	BMb0513		1:	CAAAGGCCTAGGATCTACAA	54		Cordoba in sod. (2012)
			2:	CCTTCACAACACTGCTACAAA			
208	BMb0519		1:	CGGGAACCTAGACACACTAC	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	TGATTTACCTTAGCTTCCCA			
209	BMb0521		1:	AACACAGGGCAAATTACTGT	53		Cordoba in sod. (2012)
			2:	TTGAGTGATACGCAGAAAGA			

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge B.

Št.	Lokus	Mikrosatelitska ponovitev	F: R:	Nukleotidno zaporedje parov začetnih oligonukleotidov v smeri 5' – 3'	Tm (°C)	D (bp)	Referenca
210	BMb0531		1:	CAAATTCATAAGCGTCACAA	51		Cordoba in sod. (2012)
			2:	CCAAGAATGATTTAGTGGGA			
211	BMb0539		1:	TTCCAGGTTATTTTCATTTCTTT	46		Cordoba in sod. (2012)
			2:	TGAGTTATGAGTTAAGTACAGCA			
212	BMb0559		1:	ACTAATGGCAACGTCAAAAC	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	GAGGTTCTTCATCCTCAACA			
213	BMb0563		1:	TTGCTGCTATGAACTGATTC	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	CCATGAAACTGACTTTGGTT			
214	BMb0571		1:	CTCCCAAATTTGTTGAAGAG	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	GTAACAATAGCAGTGAGGGC			
215	BMb0578		1:	AAGTGGAGGGTGAAACATTA	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	CGCTAACGTTATTTCTCCAT			
216	BMb0581		1:	GCTTACGTGCACCTTTATTT	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	CATTTAGGTCAGCTCGATTT			
217	BMb0588		1:	ATTATCCAAACATGATCCGT	51		Cordoba in sod. (2012)
			2:	TCATACTGAAGTCATGCCAA			
218	BMb0590		1:	TAGTTGTTGGTACGCATCTG	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	TGACAATCAGACAACCTTGA			
219	BMb0601		1:	ATTGATCGTATGCAAGGTTT	51		Cordoba in sod. (2012)
			2:	ACCTGCCATAAATAATGTGT			
220	BMb0611		1:	TTTCAACCAATATGAAAGCA	45		Cordoba in sod. (2012)
			2:	TGTTTAATCAACTGCTGCAA			
221	BMb0619		1:	GATGGACACACTCACAAACA	54		Cordoba in sod. (2012)
			2:	TGTGTTCTACCACCAACAGA			
222	BMb0621		1:	TGTGCTTAGTGTGTGAGGAG	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	TGAATGTCCCTTATTGGAAC			
223	BMb0653		1:	ATTTGTAAAGAACTCGCCAA	48		Cordoba in sod. (2012)
			2:	AGATAACAAGAACAATCATAAA G			
224	BMb0654		1:	CGCATCGATCAAAGATAGTC	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	CTCTTTCCCAACAAATGAAG			
225	BMb1010		1:	GATAACCAGATAAGACAGACC	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	TAGATATTCTATCGCTCAGG			
226	BMb1016		1:	CTACAGTTGTTACTCGTGTGT	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	GGAGAAACACTTGATGATAC			
227	BMb1024		1:	CTCTAGAAATCTCTCCAATC	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	CTATGCTCTTCCTAATGACA			
228	BMb1036		1:	ACATATGAAGTGAGTGAAGG	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	GATCTCAATCTGAAAGTGTG			
229	BMb1067		1:	CGACATACCAAACCTTTATCC	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	TGGTTATGATGTGTACTAGGTC			
230	BMb1071		1:	ATAGCATAGACACTCGGATA	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	GTATCGGTGGAGTATTTAAC			
231	BMb1074		1:	ATCCCATCATAACAAGCTAC	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	ACTAACCACACTAACCCTACT			
232	BMb1079		1:	ACTACAGGAAAGACTAACACAG	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	TTTCTTAGAGAGAGGGTTTC			

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge B.

Št.	Lokus	Mikrosatelitska ponovitev	F: R:	Nukleotidno zaporedje parov začetnih oligonukleotidov v smeri 5' – 3'	Tm (°C)	D (bp)	Referenca
233	BMb1080		1:	AGGGTTTGTGTTGAGTG	49		Cordoba in sod. (2012)
			2:	CCTATACTGTAAGTGGATGC			
234	BMb1093		1:	AACTCATAGTAGAGACACAACC	48		Cordoba in sod. (2012)
			2:	GAGATTAGGGTAGTAGATTGG			
235	BMb1095		1:	AGGAACAGAAGATATGCAG	51		Cordoba in sod. (2012)
			2:	GCTAGTAGGTAATTTGACACC			
236	BMb1102		1:	TGGTAGAGCTTCTTGAACATA	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	GGAGATCAAACAAATCTCTG			
237	BMb1113		1:	CGTTGACAAAGAGCATGTAT	49		Cordoba in sod. (2012)
			2:	GAGTAATTGTCTACTTCTCCAG			
238	BMb1117		1:	CATGAACCGTTAGACTTTAG	48		Cordoba in sod. (2012)
			2:	TAGGGAGCTTACCTAGATTAC			
239	BMb1142		1:	CACTGTTCTCCTAACACATT	48		Cordoba in sod. (2012)
			2:	TAGGACACACTTGATATTCC			
240	BMb1157		1:	GGACAAGACAAACGTATAGA	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	CATCTTGACACGACTCTG			
241	BMb1162		1:	GCTGATGATATGTCTTGTCT	49		Cordoba in sod. (2012)
			2:	GAAACAGATTCCAGAGAGA			
242	BMb1171		1:	CAGGTAATCTTTCGTCTTCT	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	GATATGCTTGTAGAACTGTGTC			
243	BMb1188		1:	AGTCATCACGAACCTTTCAC	51		Cordoba in sod. (2012)
			2:	GCTCACTTGATCACTAAATG			
244	BMb1191		1:	CTACAGGTTGTACTTTTGCT	51		Cordoba in sod. (2012)
			2:	CACTGATGTACGACAAATG			
245	BMb1195		1:	GTTACAAAATGGTGGTCTC	49		Cordoba in sod. (2012)
			2:	GGAGAACTCCTCTTACCATA			
246	BMb1198		1:	GCCTATCCTACTTGGTTTAT	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	GATCTCGATATGTTATCTGC			
247	BMb1200		1:	CCACCAATATGTATCCTAAG	48		Cordoba in sod. (2012)
			2:	GGCGATGTAAGATTAGAGA			
248	BMb1203		1:	TTATCTTGCTCTCTGTAGAGTC	49		Cordoba in sod. (2012)
			2:	AGACTGGACTTGTCTCTTTT			
249	BMb1206		1:	GAAGTCCAATTATGCAGAG	51		Cordoba in sod. (2012)
			2:	CTCAAGGTCAAAATGTCAC			
250	BMb1208		1:	CTCTCTTTCCAATTAGTCAC	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	CTATGATGTCACCCACTATC			
251	BMb1215		1:	CGTGTCTAAATAGAGGAGAA	48		Cordoba in sod. (2012)
			2:	ACTTGAGACAACTCTAGCTCT			
252	BMb1228		1:	AGTCACCCTATAAACCCCTAA	49		Cordoba in sod. (2012)
			2:	TCTCACTCTCGATATGTTTC			
253	BMb1230		1:	GGTTCGCAAAGTGTTAATAG	49		Cordoba in sod. (2012)
			2:	CTCTATATTCAACCTCTCACAC			
254	BMb1244		1:	GTTTCATCTTTCAGGACACT	52		Cordoba in sod. (2012)
			2:	GAAGAATAAGGAGGTAAAGG			
255	BMb1263		1:	TGCTTCTCTCAGTATGATTC	49		Cordoba in sod. (2012)
			2:	CTTCAAGTAAACCACACAGT			
256	BMb1275		1:	CAAGATACTTCTGTACTAGTGG	47		Cordoba in sod. (2012)
			2:	CGACCTGTACCATTATACTT			

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge B.

Št.	Lokus	Mikrosatelitska ponovitev	F: R:	Nukleotidno zaporedje parov začetnih oligonukleotidov v smeri 5' – 3'	Tm (°C)	D (bp)	Referenca
257	BMb1536		1:	GCTAGAGAGTAGAGAACACAAC	49		Cordoba in sod. (2012)
			2:	GCCTTTTCTCGTATAAGTGT			
258	BMc121	(GA)19	1:	TGCATTACACCGCTATTACGA	59	160	Blair in sod. (2009a)
			2:	CACTGTAGCCACCATGAGCA			
259	BMc128	(TAA)5	1:	AATAACTGAGCAATAGAATGCCT AA	56	181	Blair in sod. (2009a)
			2:	AAAGGGTTCGATTGTGACTGTG			
260	BMc129		1:	ACGTCCTCTACCAGCAAACA			Blair in sod. (2009a)
			2:	TTTAGAACTGGGCACCTTGG			
261	BMc135	(CAT)4	1:	AACCATTTTTACCGATTTACCA	56	120	Blair in sod. (2009a)
			2:	CCGAGTCCTAATGGGTTC			
262	BMc138	(CCA)7	1:	CCAAATCTGATTACATACGAACA	56	120	Blair in sod. (2009a)
			2:	GGGAGGGACATGGACTTTCT			
263	BMc139	(GCT)6	1:	TGAGTCGACATCAAGCCAGA	59	124	Blair in sod. (2009a)
			2:	ACCGGAGGGTGAAGAGTGTA			
264	BMc142	(TGC)5	1:	TTGGAAGTGGTCTGAGTTGG	59	121	Blair in sod. (2009a)
			2:	TCATGTGACTGCTGATCAAAAA			
265	BMc143	(TGC)5	1:	GGGTGGCTACACCATTTTCAG	59	128	Blair in sod. (2009a)
			2:	TCACAGCTTTTCTTTCTGTTCC			
266	BMc144	(CCG)4	1:	TCGCTAGTCACGCTCAGAAG	59	106	Blair in sod. (2009a)
			2:	GAAGATTCCATCACCGTATCG			
267	BMc224	(TC)10	1:	CCACTTTATAATTTCTACTACTTC TCTC	52	116	Blair in sod. (2009a)
			2:	GGAGCTTAAGAAGGTCAATTC			
268	BMc234	(TC)6(CT)11	1:	CAACACCATAACCAAAACGACA	59	93	Blair in sod. (2009a)
			2:	ACGGAGGAAGGAGATGGAGT			
269	BMc238	(CT)20(GAC)3	1:	CCAAACCTCTCTCTCTCTCTCTC	57	142	Blair in sod. (2009a)
			2:	CGAACTCTTCGTCCTCCTGA			
270	BMc248	(TC)14	1:	CAAGCAAAATCTCTCCTTTTC	54	90	Blair in sod. (2009a)
			2:	ACCCTAGTGGGTGAGTGTGG			
271	BMd01	AT	1:	CAAATCGCAACACCTCACAA		165	Blair in sod. (2003)
			2:	GTCGGAGCCATCATCTGTTT			
272	BMd03	CGG	1:	TGTTTCTTCCTTATGGTTAGGTTG	60	106	Blair in sod. (2003)
			2:	GTATCCTCCGATCAAATTCACCT			
273	BMd07	TGG	1:	GGATATGGTGGTGATCAAGGA	58	166	Blair in sod. (2003)
			2:	CATACCCAATGCCATGTTCTC			
274	BMd08	CT	1:	TTCATCCTCTCTCCCGAACTT	59	176	Blair in sod. (2003)
			2:	CTTTTGTGGCTGAGACATGGT			
275	BMd09	CATG	1:	TATGACACCACTGGCCATACA	58	135	Blair in sod. (2003)
			2:	CACTGCGACATGAGAGAAAGA			
276	BMd10	GA	1:	GCTCACGTACGAGTTGAATCTCA G	64	139	Blair in sod. (2003)
			2:	ATCTGAGAGCAGCGACATGGTAG			
277	BMd11	GA	1:	GCTCAACATTCCAGAGGCTAA	55	161	Blair in sod. (2003)
			2:	TCAAACCTACATAAATAAAACAA AACA			
278	BMd12	AGC	1:	CATCAACAAGGACAGCCTCA	59	167	Blair in sod. (2003)
			2:	GCAGCTGGCGGGTAAAACAG			

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge B.

Št.	Lokus	Mikrosatelitska ponovitev	F: R:	Nukleotidno zaporedje parov začetnih oligonukleotidov v smeri 5' – 3'	Tm (°C)	D (bp)	Referenca
279	BMd14		1: 2:	TCGCTCCAAGTGCATGTAAG TGGGAAACAAAACAAGAAGA			Blair in sod. (2003)
280	BMd15	AG	1: 2:	TTGCCATCGTTGCTTAATTG TTGGAGGAAGCCATGTATGC	60	166	Blair in sod. (2003)
281	BMd16	CATG	1: 2:	ATGACACCACTGGCCATACA GCACTGCGACATGAGAGAAA	59	136	Blair in sod. (2003)
282	BMd17	CGCCAC	1: 2:	GTTAGATCCCGCCCAATAGTC AGATAGGAAGGGCGTGGTTT	58	116	Blair in sod. (2003)
283	BMd18	TGAA	1: 2:	AAAGTTGGACGCACTGTGATT TCGTGAGGTAGGAGTTTGGTG	58	156	Blair in sod. (2003)
284	BMd19	CCT	1: 2:	GCCAACCACATTCTTCCCTAC GGAAGCGAGGCAGTTATCTTT		154	Blair in sod. (2003)
285	BMd20	TA	1: 2:	GTTGCCACCGTGATAATCT GTGAGGCAAGAAGCCTTCAA	59	123	Blair in sod. (2003)
286	BMd21	CCT	1: 2:	GGCTCCACCATCGACTACTG TGCGATGTTTGAGCATTTGT		190	Blair in sod. (2003)
287	BMd22	TC	1: 2:	GGTCACTCCCGAGCATTC CGGGAAATGGAAGTCACAGT	58	121	Blair in sod. (2003)
288	BMd25	GAT	1: 2:	GCAGATCGCCTACTCACAAA CGTTGACGAGAAGCATCAAG	58	118	Blair in sod. (2003)
289	BMd26	GAT	1: 2:	CTTGCCTTGTGCTTCCTTCT TCCATTCCCAACCAAGTTTC	58	141	Blair in sod. (2003)
290	BMd27	CCA	1: 2:	GGACCCACCATCACCATAAC TGGTGGAGGTGGAGATTTGT	56	109	Blair in sod. (2003)
291	BMd28	GT	1: 2:	TGCATCAACTTTAGGAGCTTG TCTTGCTTATCAGCAGGTGGA	57	151	Blair in sod. (2003)
292	BMd29	GAA	1: 2:	CTTCACCGATCTGACAGCAG TTTCTCCACTGGAACACTCG	58	159	Blair in sod. (2003)
293	BMd32	CTT	1: 2:	ACACCCTTCATCTCCCTCAT ACCCATGTTGGATGTTGGAT	57	150	Blair in sod. (2003)
294	BMd33	ATT	1: 2:	TACGCTGTGATGCATGGTTT CCTGAAAGTGCAGAGTGGTG	59	110	Blair in sod. (2003)
295	BMd36	TA	1: 2:	CATAACATCGAAGCCTCACAGT ACGTGCGTACGAATACTCAGTC	58	164	Blair in sod. (2003)
296	BMd37	AC	1: 2:	GGCACGAGCAACAATCCTT CCATCATAGAGGGCAACCAC		134	Blair in sod. (2003)
297	BMd38	GA	1: 2:	GCGTTTCCATGAATCAATCC AAATTCCGAACCCGTGAACT	59	178	Blair in sod. (2003)
298	BMd40	AT	1: 2:	AACCTTCTTGCGCTGATCTC TAGTGGCCATTCTCTGATCT	58	197	Blair in sod. (2003)
299	BMd41	ATT	1: 2:	CAGTAAATATTGGCGTGGATGA TGAAAGTGCAGAGTGGTGGA	58	250	Blair in sod. (2003)
300	BMd42	AT	1: 2:	TCATAGAAGATTTGTGGAAGCA TGAGACACGTACGAGGCTGTAT	62	149	Blair in sod. (2003)
301	BMd43	CCT	1: 2:	CAGCATCAAGAAGACCCAAG CAGCACCACTATGGGAGGAC	57	176	Blair in sod. (2003)

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge B.

Št.	Lokus	Mikrosatelitska ponovitev	F: R:	Nukleotidno zaporedje parov začetnih oligonukleotidov v smeri 5' – 3'	Tm (°C)	D (bp)	Referenca
302	BMd44	AG	1:	GGCAGCTTACTAACCCGAAA	60	135	Blair in sod. (2003)
			2:	TTCCTTCCCCTTTCTTCTCC			
303	BMd45	AG	1:	GGTTGGGAAGCCTCATACAG	58	129	Blair in sod. (2003)
			2:	ATCTTCGACCCACCTTGCT			
304	BMd46	TCT	1:	GGCTGACAACAACCTCTGCAC	58	158	Blair in sod. (2003)
			2:	CTGGCATAGGTTGCTCCTTC			
305	BMd47	AT	1:	ACCTGGTCCCTCAAACCAAT	58	150	Blair in sod. (2003)
			2:	CAATGGAGCACCAAAGATCA			
306	BMd50	AAC	1:	TGGTGAGAGAAGGACAATAGCA	58	124	Blair in sod. (2003)
			2:	GCCGCTTGTGACGTTTATTT			
307	BMd52	ATT	1:	TCTGGTGCGCAGAAAGTTA	55	151	Blair in sod. (2003)
			2:	AAGGCTTTGTTTTGATTAAGGTT			
308	BMd53	GTA	1:	TGCTGACCAAGGAAATTCAG	60	105	Blair in sod. (2003)
			2:	GGAGGAGGCTTAAGCACAAA			
309	BMd54	CCT	1:	GGCTCCACCATCGACTACTG	59	154	Blair in sod. (2003)
			2:	GAATGAGGGCGCTAAGATCA			
310	BMd56	AT	1:	AATGCGTGAGCATGATTAAGG	59	193	Blair in sod. (2003)
			2:	TCATCTGTGAGCACCACAAACC			
311	BMd57	TA	1:	GAGGCAAAGAAGCTATTGAA	53	140	Blair in sod. (2003)
			2:	TTTTTAATTCTGTGAATTGTTT			
312	BMg0069		1:	CCGTGTCTCTTGGTCTTTCA	58		Chen in sod. (2014)
			2:	AAGGCAGTGGTAGAAGAAAAGC			
313	BMg0087		1:	TTCTTTCACAGAGCAAACCC	57		Chen in sod. (2014)
			2:	GGAGAGAATGGATGGGAAGA			
314	BMg0090		1:	GGATTGGACGTAGCCCAGTA	57		Chen in sod. (2014)
			2:	GGCCTTTGTCCATTTCTTCT			
315	BMg0105		1:	AAAACCGTCAAGGTCTGGTC	57		Chen in sod. (2014)
			2:	GAGAGTGCACGTGAAGCAG			
316	BMg0112		1:	CGCAACACTCCAAGGTATGA	58		Chen in sod. (2014)
			2:	TGCTTCATCCAGAGGAACAG			
317	BMg0118		1:	ATCCACACCCTTCTCTCTGC	58		Chen in sod. (2014)
			2:	GTGCCTGTGAGTGAGTGGTC			
318	BMg0127		1:	GACACGCACAACCTCAAAAGC	57		Chen in sod. (2014)
			2:	TAAGTAGAGGGGAGGGAGCA			
319	BMg0139		1:	GAGCTTCATTCAGATCCGGT	58		Chen in sod. (2014)
			2:	CTGAAGCAGCACCTGTGAGT			
320	BMg0146		1:	AACCTATCAAAATCCGCACC	57		Chen in sod. (2014)
			2:	CTTCGTCCGTCTTCTTCGTC			
321	BMg0147		1:	TTTTTCTCTTCCGATGGACC	58		Chen in sod. (2014)
			2:	AGGAAAGAGCGATTGAGCAT			
322	BMg0169		1:	GTTTTCTCCTCCGAACCAAG	57		Chen in sod. (2014)
			2:	ATTTCCCCAGGAGGAGAGTT			
323	BMg0207		1:	CAAGTCACTCTCATCGGCAT	58		Chen in sod. (2014)
			2:	AGTGGGGAAAAATCACAAGC			
324	BMg0214		1:	TGTCTCTGCTTCGAACTTGG	58		Chen in sod. (2014)
			2:	CTTTTTCCTTCACGCTCCAT			

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge B.

Št.	Lokus	Mikrosatelitska ponovitev	F: R:	Nukleotidno zaporedje parov začetnih oligonukleotidov v smeri 5' – 3'	Tm (°C)	D (bp)	Referenca
325	BMg0589		1:	CCTCTATACGTGGGGTGGTT	58		Chen in sod. (2014)
			2:	TCCATTACTCCCTCCACCTC			
326	BMg0625		1:	TCCTTGTCGTTTCAGTCTCG	58		Chen in sod. (2014)
			2:	GTACACGAAAATGTGGCTGG			
327	BMg0643		1:	CACCACTCTGAGATCTTGCC	57		Chen in sod. (2014)
			2:	GCTCGAGAACAACATGGAGA			
328	BMg0644		1:	GCTACAGGTTCAAAGCTCCC	58		Chen in sod. (2014)
			2:	ACCACCGAACTCTCTCTCGT			
329	BMg0653		1:	CCGCTCTTTCCCAAAGTTAG	58		Chen in sod. (2014)
			2:	GAAGAAGTGCAGGGAAGGAG			
330	BMg0654		1:	CAAACCTCCCGAAGTCTGTAA	54		Chen in sod. (2014)
			2:	CACCAGAAGCCTCATAATCG			
331	BMg0661		1:	CAACCATGAGAATGGAGGTG	58		Chen in sod. (2014)
			2:	TTCTGCGTACTGACACACCA			
332	BMg0662		1:	CTTCCAATTTACAAACCCC	58		Chen in sod. (2014)
			2:	TCTCAGATGACACCCTCAGC			
333	BMg0709		1:	CCTCCTCCGAATCAGAACTC	57		Chen in sod. (2014)
			2:	AAGGAGGAAAAGGAGAAGGG			
334	BMg0720		1:	ACCCAATTTTCGGAACCTGAAC	58		Chen in sod. (2014)
			2:	GGACTCTGCTACACCGCATA			
335	BMg0724		1:	CGACCTGCATACCATAACCAG	58		Chen in sod. (2014)
			2:	CATTGTGATGCCGTAGGTTT			
336	BMg0749		1:	ACAAGTGGGGTAGGCTATGG	52		Chen in sod. (2014)
			2:	TTAACCACCCTCCTCAGCTT			
337	BMg0765		1:	CGATTACAGCAGTTCAAAAC	52		Chen in sod. (2014)
			2:	GCTGATCTCGAAGCTCCTCT			
338	BMg0799		1:	CAACCCACACCACACCATAAC	52		Chen in sod. (2014)
			2:	TTGTGGTTCAAACCGTGAAT			
339	BMg0800		1:	GGAATGCGTAATGCGAATAG	57		Chen in sod. (2014)
			2:	GTGTGTCAGGAAACAGACCG			
340	BMg0810		1:	GTGGGCAATTTTAATGGCAG	58		Chen in sod. (2014)
			2:	CTCTTCTCTCCGACCTCACC			
341	BMg0819		1:	AACATCCCAAAAACCTCCACC	58		Chen in sod. (2014)
			2:	CAAGGCTGTTTGATGTGGAC			
342	BMg0834		1:	CAAGTGCAATTGACCTCATCC	58		Chen in sod. (2014)
			2:	CAGTGGATTGTGTCTCTGGG			
343	BMg0835		1:	CCATTGTCTCTTCCTCTGTCTG	58		Chen in sod. (2014)
			2:	TCAGAGGATGTTGTTGCCAT			
344	BMg0864		1:	ACCGTGAAAATTGCAGTGAG	58		Chen in sod. (2014)
			2:	TCGGCGTATTTTCTCTTCCT			
345	BMg0871		1:	CCTCTTCTCCCTTTCCCTCT	58		Chen in sod. (2014)
			2:	TGCGATTGAAGGTATCGAAG			
346	BMg0882		1:	CGAATCCAATGTCTCTCCCT	58		Chen in sod. (2014)
			2:	CCTCTCCCCCTCTTCTTCTT			
347	BMg0895		1:	CTCTGAGCCACGACCTACAG	58		Chen in sod. (2014)
			2:	GATGTGACCACGTGAAGAGG			

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge B.

Št.	Lokus	Mikrosatelitska ponovitev	F: R:	Nukleotidno zaporedje parov začetnih oligonukleotidov v smeri 5' – 3'	Tm (°C)	D (bp)	Referenca
348	BMg0898		1:	TAGTGAGGCCACTGAATTGC	58		Chen in sod. (2014)
			2:	GGTGTGAGAACTGAGCCA			
349	BMg0900		1:	GTGTGAACGGCAACAAAAC	58		Chen in sod. (2014)
			2:	GAATCCGAATTTGTGGGTCT			
350	BMg1511		1:	GCTGCGTCTTAATCTCTCCC	57		Chen in sod. (2014)
			2:	AAGGAGGAAAAGGAGAAGGG			
351	BMg1526		1:	CATGATCTTGTCTCTCGTTGG	58		Chen in sod. (2014)
			2:	GCATCAAAACCTTGCTCTCA			
352	BMg1537		1:	GAGAAAGGAGGCACAGAAGG	58		Chen in sod. (2014)
			2:	TCCCTCCTCAATCTTGTTTC			
353	BMg1564		1:	CCCACCAAACCAATGAGATT	58		Chen in sod. (2014)
			2:	AGTCAGGTCCATAAATCCCG			
354	BMg1581		1:	TGCGTTTCATCGGAAGACTA	58		Chen in sod. (2014)
			2:	CCCCATGCATTATCATCAAC			
355	BMg1608		1:	CAAAGAGGGTGAATGGGTCT	57		Chen in sod. (2014)
			2:	ATAAGGAGTGTGTGGTGCGT			
356	BMg1820		1:	CTTCTTCTTCTCCCCCTCT	58		Chen in sod. (2014)
			2:	TCATGACCTTGTTCCAGCAT			
357	BMg1876		1:	TCTCTTCCACCACCCTCTCT	58		Chen in sod. (2014)
			2:	TTTCTGGACTCCAACATTCTG			
358	BMg1888		1:	CTGTCACCTCTGTTCCCTTCG	57		Chen in sod. (2014)
			2:	CGCGGATCACTTCAATTACA			
359	BMg1920		1:	GAGAAGAGAAGAGGTGTTTCGG	57		Chen in sod. (2014)
			2:	CTCCTCCATCCACTTCCATT			
360	BMg2058		1:	TATTTCCCTCTCTCGAACCC	57		Chen in sod. (2014)
			2:	GCTGTGCACCAGAAGAAGAG			
361	BMg2113		1:	GGCCAAGATCAAGTTCACAA	58		Chen in sod. (2014)
			2:	TCACCTACCAGATCCCAAAGG			
362	BN	(TAT)9	1:	CAG CTT AGC ATT GAA TGT TG	56	144-162	Blair in sod. (2008)
			2:	GAA AGA GCA GTA TAA GTC CT			
363	CA3	(CA)12 (3)	1:	AAC TGT CCA CCC ACG TAT CT	56	128	Blair in sod. (2008)
			2:	GAG GAC TAC GTA CAA GTG AC			
364	CA5	(CA)13 (3)	1:	ATA GAT GAG GTA TGT GAA AG	50	140-144	Blair in sod. (2008)
			2:	GGG ATA ATG TAA GAT GTA AG			
365	CAC1	(GA)31 (2)	1:	ACA AAC AAT TAT AAA GAG TG	48	74-114	Blair in sod. (2008)
			2:	GTT GAG TGA ACC AAT ATA AA			
366	CAC2	(GA)29 (2)	1:	AAA TTG GTT GTG TAA ATC TC	48	59-93	Blair in sod. (2008)
			2:	CAA TTA TAA AGA GTG AGA GA			
367	GA04	(GA)15 (1)	1:	AGG TGT AGT CGT TTC ACT TC	52	145-162	Blair in sod. (2008)
			2:	CTG TTC TTG AAA CCT ACA AG			
368	GA12	(GA)16	1:	TAA AAC AGA CAG TTA TAA GG	44	108-118	Blair in sod. (2008)
			2:	TTG TAA TCT GTG AGT GAT TA			
369	GA15	(GT)13 (GA)22 (3)	1:	GGT TGA GTG AAC CAA TAT AA	48	112-170	Blair in sod. (2008)
			2:	CGA TTG TTT ATA GAA GCA GA			
370	GA16	(GT)12 (4)	1:	CAA CAA AAT CAA ATC AAA CAA T	43	145	Blair in sod. (2008)
			2:	GGT TGA CTG AAC TAA TAT AAA			

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge B.

Št.	Lokus	Mikrosatelitska ponovitev	F: R:	Nukleotidno zaporedje parov začetnih oligonukleotidov v smeri 5' – 3'	Tm (°C)	D (bp)	Referenca
371	GATS11	(CT)8CA(CT)2 GTTT(CT) 4	1: 2:	CACATTGGTGCTAGTGTCGG GAACCTGCAAAGCAAAGAGC	60	306	Gaitan-Solis in sod. (2002)
372	GATS11 B	(CT)8	1: 2:	CCCACACATTGGTGCTAGTG AGCGCAATGCTACTCGAAAT	60	160	Gaitan-Solis in sod. (2002)
373	GATS54	(GA)5AACAG AGT(GA)8	1: 2:	GAACCTGCAAAGCAAAGAGC TCACTCTCCAACCAGATCGAA	60	114	Gaitan-Solis in sod. (2002)
374	GATS91	(GA)17	1: 2:	GAGTGCGGAAGCGAGTAGAG TCCGTGTTCTCTGTCTGTG	60	229	Gaitan-Solis in sod. (2002)
375	HRG	(AT)22	1: 2:	GCT CAT ATT TGG GAG AAA TC ATT GTT TGT TGC CTT TCC CA	56	114- 230	Blair in sod. (2008)
376	ME1	(AT)12	1: 2:	ATA CGA GGT TAG CCT AAA TC ATT CAC CGT CAA ACT CGC AA	48	174- 198	Blair in sod. (2008)
377	PG2	(CGG)8	1: 2:	CAT TCC CTG AAG CCC GAA T CGG TGA TTG ACC AGA GAA G	60	132- 138	Blair in sod. (2008)
378	PV-ag001	GA	1: 2:	CAATCCTCTCTCTCTCATTTCCT GACCTTGAAGTCGGTGTCTGTTT	62	157	Yu in sod. (2000)
379	PV-ag003	(AG)8	1: 2:		64	164	Yu in sod. (2000)
380	PV-ag004	(AG)8	1: 2:		64	201	Yu in sod. (2000)
381	PVBR005		1: 2:	ATTAgACgCTgATgACAgAg AgCagAATCCTTTgAgTgTg	54		Buso in sod. (2006)
382	PVBR010		1: 2:	ACAACAACAgAgAATCTCTC AAggATgAgAAggAggAC	52		Buso in sod. (2006)
383	PVBR014		1: 2:	TgAgAAAgTTgATgggATTg ACgCTgTTgAAggCTCTAC	42		Buso in sod. (2006)
384	PVBR015		1: 2:	CCTACgCgACAAGATTggCA CAgAAAaggAAACATAAAC	52		Buso in sod. (2006)
385	PVBR019		1: 2:	gAgAgggAggCATAAAGAgg TgCACTCCgACgATCAAgtT	52		Buso in sod. (2006)
386	PVBR025		1: 2:	GAGCTTCTCCGTCTGTGT CGAACTGAATCAGAAAGGAA	52		Buso in sod. (2006)
387	PVBR035		1: 2:	TCTACGCGTTCCCTCTGTCT AGTGGATGTGTGGGAAAAGC	54		Grisi in sod. (2007)
388	PVBR053		1: 2:	GATCCTTTCCCCACAAAACA GGGGAATGGCAAAGAAGT	52		Grisi in sod. (2007)
389	PVBR093		1: 2:	TGGGGTGAGAGAGAAAGGTG TACCATAGCAGGCGTTGTTG	52		Grisi in sod. (2007)
390	PVBR107		1: 2:	CCCCTTTCTCACCCTTCAG ACCAAAAACGGTGCTCAAAC	54		Grisi in sod. (2007)
391	PVBR163		1: 2:	TGAGAGTGGAGAAGGAGAGAGA TGACAACACTGCAAACACCA	54		Grisi in sod. (2007)
392	PVBR167		1: 2:	GGCAAAAACAAAACCATTTCA GCCATTTCTCCACTGTCTGG	51		Grisi in sod. (2007)

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge B.

Št.	Lokus	Mikrosatelitska ponovitev	F: R:	Nukleotidno zaporedje parov začetnih oligonukleotidov v smeri 5' – 3'	Tm (°C)	D (bp)	Referenca
393	PVBR169		1:	TGGAAAGTCGGAGGAGAAGA	54		Grisi in sod. (2007)
			2:	AAAAGGGTCCCAACCAAAAC			
394	PVBR182		1:	CGCGCACGTAGGTACTACAA	52		Grisi in sod. (2007)
			2:	CAACAACACCACCCTGAGAC			
395	PVBR185		1:	TGGTAAAGCAAAAACGATGG	52		Grisi in sod. (2007)
			2:	GACAGAAGAGTGAGGGTGTGAA			
396	PV-ctt001	(CTT)(T)(CTT)	1:	GAGGGTGTTCCTACTATTGTCCTGC		152	Yu in sod. (2000)
			2:	TTCATGGATGGTGGAGGAACAG			
397	PV-ctt004		1:	AATCTGCCGAGAGTGGTCCTGCC			
			2:	GATTGAAATATCAAAGAGAATTGTTAC			
398	PV-ctt006		1:	CCGTTGCCTGTATTTCCCAT			
			2:	CGTGTGAAGTCATCTGGAGTGGTC			
399	PvM002		1:	CGCCATTTGGATTGGATT	58		Hanai in sod. (2007)
			2:	AGGCGTGGAAGTGGAGTG			
400	PvM003		1:	CCGCCTTCTTCTTCTTCTTC	57		Hanai in sod. (2007)
			2:	CGGCGAGTCATCTTTTCC			
401	PvM004		1:	GGTTCCTCCTCCTCTGCT	57		Hanai in sod. (2007)
			2:	GCGCCGTCTTTTTGGTAGT			
402	PvM007		1:	CTGGAATGGCTTACAGATGC	57		Hanai in sod. (2007)
			2:	CCAAGATCAGGCACAGTGAA			
403	PvM010	(ACT)5	1:	GAAGGGCAATGGCTGAAG	58	256/256	Hanai in sod. (2010)
			2:	TCCCGTGGAACACTTGG			
404	PvM011		1:	TGGGATTTTGAGCGTGTG	58		Hanai in sod. (2007)
			2:	TCCACCGACTTACCGAACA			
405	PvM012		1:	CCAGTGTGTCAACAAATGGA	57		Hanai in sod. (2007)
			2:	AGGCTTAGGGAATGGCTCA			
406	PvM013a		1:	GAGAAGCCGCAGAGAGGA	58		Hanai in sod. (2007)
			2:	AGATGCCGCGAACAGAAC			
407	PvM014		1:	AAAGCCACAAAAACCATAAACC	57		Hanai in sod. (2007)
			2:	GCCTCCGAAAGATTCAACG			
408	PvM015		1:	GGTGGAGGCAGTGGTGTT	57		Hanai in sod. (2007)
			2:	TTCACTTTCCCAAGACCTGA			
409	PvM017		1:	AGGATGGGTTCCGTGCTT	60		Hanai in sod. (2007)
			2:	GGCAGCTTCCACATCGTC			
410	PvM018		1:	CAACCATCTCTGTGGCAAG	56		Hanai in sod. (2007)
			2:	TGAGTTTGGGAGAGTGAGTTT			
411	PvM022		1:	ACTCTCACAATGGCGGAATC	58		Hanai in sod. (2007)
			2:	GGCGTTTCTCCCTCTTCTT			
412	PvM034		1:	CTTCTCCCTCTTCCTCCT	46		Hanai in sod. (2007)
			2:	GGACAGTGATAGTTCAGATTC			
413	PvM036		1:	GCCCCCTATTTCCCTACC	53		Hanai in sod. (2007)
			2:	CATCTTCTCCTCACCTTA			
414	PvM046		1:	CGCTTATGTTGGGTGGAG	56		Hanai in sod. (2007)
			2:	CGTGAAGGAGAGGGGAGA			

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge B.

Št.	Lokus	Mikrosatelitska ponovitev	F: R:	Nukleotidno zaporedje parov začetnih oligonukleotidov v smeri 5' – 3'	Tm (°C)	D (bp)	Referenca
415	PvM052	CA7	1: 2:	TCCTCTGCAAACAAAACCCTA TTCGCCAAATTCGACAATCT	59	204/5 00	Hanai in sod. (2010)
416	PvM053	TC6	1: 2:	TGGGGGAATTGAGTGAACAT TCTTTCTTGCGCTTTTCTCTTC	59	200/2 00	Hanai in sod. (2010)
417	PvM056	TA6	1: 2:	AGCTGGCAGAAACTTGGAAA TTGAAACCCAGGTCTATTCTCTTC	59	214/2 14	Hanai in sod. (2010)
418	PvM059	CT5	1: 2:	TGAGGCACACTTCGACTACAA ATGGCAAGAACGTGAAAAGG	58	158/1 58	Hanai in sod. (2010)
419	PvM061	AC6	1: 2:	GAAAAAGCTATGGGCCACAC CGGTAGAGAATCCAGCGAGA	58	231/2 31	Hanai in sod. (2010)
420	PvM062	TC5	1: 2:	GCACCACTTTCTCAGATTTGG CTGTCATGGCGATGGTGTTA	58	172/1 72	Hanai in sod. (2010)
421	PvM066	AT5	1: 2:	CCTCAGCAAGCTCCGTAAAC CATGCAACCTGAAACACTCC	58	196/1 96	Hanai in sod. (2010)
422	PvM068	AT6	1: 2:	CCATTACGTGTCCAAGGTCTC CAAAAAGGAATCGGACTCTAGG	59	269/2 69	Hanai in sod. (2010)
423	PvM070	AT6	1: 2:	GAAGGGTCATTGTGGAC TCTTTTGTCACTCCTAATCC	50	161/1 61	Hanai in sod. (2010)
424	PvM073	AAG6	1: 2:	CTTACCCGATCTGACAGCAG TTCTCCAGGAACCCCTTCTTT	58	194/6 00	Hanai in sod. (2010)
425	PvM075	GAT5	1: 2:	ATTGGAAGGGGATGAACCT TAGGAGAGTGCCAGTGCTT	58	222/2 22	Hanai in sod. (2010)
426	PvM078	TCT6	1: 2:	CATTACTCCCTTCCCTTCCA ACTTCACTGGCACTCACAGG	57	174/1 74	Hanai in sod. (2010)
427	PvM087	TA5	1: 2:	CATCACGACAGTTTTCC CATTACATTACACCTATTCA	46	278/2 78	Hanai in sod. (2010)
428	PvM088	AG5	1: 2:	AGGTGCAAAAGCAAGAATGC TCCCCAGCAGTATGATGACA	59	208/2 08	Hanai in sod. (2010)
429	PvM093	GA5	1: 2:	TTATATGCGGAGCAAAGGATG GACCGACAAAGCCTTCATTC	58	216/2 16	Hanai in sod. (2010)
430	PvM095	AC9	1: 2:	GGGCGAGTTCATCTTCACAA AGGATCAACAGCCTCCAGTG	59	243/4 00	Hanai in sod. (2010)
431	PvM097	TA5	1: 2:	CAAGAGTGAAGGGGCAGTTT CGGCCAACCCTACTTTTAG	56	155/1 55	Hanai in sod. (2010)
432	PvM098	TC5	1: 2:	CTCCCTCCTTCACACTCTTTG GGGGTAGTCCTTTGGAACG	57	114/1 14	Hanai in sod. (2010)
433	PvM100	AT7	1: 2:	GCCAATAACATCACCTCAT GGGTAGTCAGTTTCTAAGCA	51	290/2 90	Hanai in sod. (2010)
434	PvM103	AG8	1: 2:	CGAGAAAGAGAGAGAAGAGTTT GTGTTGGTGTGATGCTGAG	53	145/1 45	Hanai in sod. (2010)
435	PvM115	CT25	1: 2:	AAATGTAAAGTGCTCCAT CTGAGAGAAAGAAAGAGACA	46	143/1 43	Hanai in sod. (2010)
436	PvM118	TC8	1: 2:	GCGAACACATTCACACAACA AATCCCGACCAAGTCTCCTT	59	215/2 15	Hanai in sod. (2010)
437	PvM120	TC6	1: 2:	CCCCATCCTCACTCACAAAC TCATTCTTCTGGTGCTGCTTT	58	211/2 11	Hanai in sod. (2010)

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge B.

Št.	Lokus	Mikrosatelitska ponovitev	F: R:	Nukleotidno zaporedje parov začetnih oligonukleotidov v smeri 5' – 3'	Tm (°C)	D (bp)	Referenca
438	PvM123	CT9	1: 2:	CCCACTACCACTCCTTTG AGCGTCTGAACCCATTG	53	194/1 94	Hanai in sod. (2010)
439	PvM124	TA5	1: 2:	TCCCCTACTGATGTGTTC AAATGTCTGGTTTTGC	46	193/1 93	Hanai in sod. (2010)
440	PvM126	TC7	1: 2:	AAATCCTCTTCCACCTTTG AACACGCACACACAGACA	53	132/1 32	Hanai in sod. (2010)
441	PvM127	TC5	1: 2:	AACTTCTTTGACCCCTCTC GCTTTGTCTTGTCTTCCA	50	155/1 55	Hanai in sod. (2010)
442	PvM128	GA11	1: 2:	GTTTCTGCGGTGAGAGTG AGCCTTCGTCGTTCTTCT	55	130/1 30	Hanai in sod. (2010)
443	PvM132	AG5	1: 2:	GCCGAAGCAGATAAAAGG TGTTCTCGTCTCCAATGC	55	191/1 91	Hanai in sod. (2010)
444	PvM145	TCC5	1: 2:	TTTCAGTTCGGGATTGTTCC ATTGGTGGAGGTGGGAGAG	58	203/2 03	Hanai in sod. (2010)
445	PvM148	CCA7	1: 2:	ACCTCAAACCCACCACAAA GAAGTGCTCCAGATGAAGG	58	191/1 91	Hanai in sod. (2010)
446	PvM150	TCT5	1: 2:	CTCCCAAGTTCCTTTTTC ATGCGTCCAACCCTTATGTC	58	199/1 99	Hanai in sod. (2010)
447	PvM153	AGA5	1: 2:	ATGGGCGATCTGGACTATGT TTGAAGACCAAGCCAAGAGAA	58	183/2 70	Hanai in sod. (2010)
448	SAP6		1: 2:	GTCACGTCTCCTTAATAGTA GTCACGTCTCAATAGGCAAA			
449	SSR-IAC003	(AC)6	1: 2:	TCCCAAATCAGCACAGG TTTCAGATCCATCAGTAGTTTC	56	296	Benchimol in sod. (2007)
450	SSR-IAC004	(AG)25	1: 2:	GGGGGTGGGATGAATGGA CAATCGGACCTGAACAATGAAA	50	241	Benchimol in sod. (2007)
451	SSR-IAC006	(TA)7	1: 2:	CCGGCTCCTGCTGACG ATGTTCTGCCTTTCGCTCCTT	56	187	Benchimol in sod. (2007)
452	SSR-IAC010	(GA)12 (AG)6 (AG)6	1: 2:	AGGAATAAAAGCCGAAGTGG GCCTCCGCCGATCAACACTA	56	290	Benchimol in sod. (2007)
453	SSR-IAC011	(GA)24	1: 2:	TGATAAAAATGGCTACACA TGATAAAAATGGCTACACA	56	214	Benchimol in sod. (2007)
454	SSR-IAC015	(TC)10	1: 2:	ATGCTCGCACCTTCAATCCA CACTCGGGCAAGCTCATAACCA	56	217	Benchimol in sod. (2007)
455	SSR-IAC020	(GA)7 (GA)2	1: 2:	GCATCGGCAGTTCATCATT AACAAAACTACAGCCATCAGC	56	184	Benchimol in sod. (2007)
456	SSR-IAC025	(CA)6CAA(CA)2CAA(CA)3CG(CA)5	1: 2:	GAGACGTTTCATAATCAATA TTCATGCACAATAAATCACT	56	297	Benchimol in sod. (2007)
457	SSR-IAC034	(GA)12	1: 2:	TTTCCCCTCTAGTTTGTGTT CTGACTGGGGTATGAGATGAG	56	196	Benchimol in sod. (2007)
458	SSR-IAC045	(TG)5	1: 2:	CAGACAACACAAATGAACAGA TTTTGCAGCAGCTATGATTAT	56	201	Benchimol in sod. (2007)

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge B.

Št.	Lokus	Mikrosatelitska ponovitev	F: R:	Nukleotidno zaporedje parov začetnih oligonukleotidov v smeri 5' – 3'	Tm (°C)	D (bp)	Referenca
459	SSR-IAC047	(GA)20	1: 2:	AAAGGGGTTGCTGAAGTT CAAGTTGGAAGAAGTGTGAG	56	306	Benchimol in sod. (2007)
460	SSR-IAC052	(GA)11	1: 2:	TGCATGTATGTAGGCGGTTTA GTGGCTTTTGCTTTTGTAGTCA	56	203	Benchimol in sod. (2007)
461	SSR-IAC055	(GA)13	1: 2:	AACCCGTGAATCTTTGAGG ATTGATGGTGGATTTTGAA	56	211	Benchimol in sod. (2007)
462	SSR-IAC059	(AC)7	1: 2:	CAAGTGACCGGAGAAGATTTTT GTGCACTCAGACGGCTCAAG	61	161	Benchimol in sod. (2007)
463	SSR-IAC061	(CA)6(AT)5	1: 2:	CACACGCACACGGCACAC TGGCAATGGAAGAAGACAAAAT	58.6	157	Benchimol in sod. (2007)
464	SSR-IAC062	(AG)14	1: 2:	AACCCGTGAATCTTTGAGG ATTGATGGTGGATTTTGAA	45.3	211	Benchimol in sod. (2007)
465	SSR-IAC066	(GA)10	1: 2:	AATCACATCTTTAACCCAACAG TTCCACTCCCTCCCTATCTT	56	282	Benchimol in sod. (2007)
466	SSR-IAC072	(TG)7	1: 2:	ATCGGTTGAATTGGCTTGAC ATTGCTTAAAGACTCCTGTTGC	45	262	Benchimol in sod. (2007)
467	SSR-IAC074	(CA)9 (TA)7	1: 2:	GGAATCGAAGTTTGAAGTGAGG AAATGACCAAGCCAAGAATGTT	60	271	Benchimol in sod. (2007)
468	SSR-IAC076	(TA)10 (TG)7 (TA)4	1: 2:	TTCATGGCCAATAATCAGG GAGAAAATTGAGGGTAGATG	60	191	Benchimol in sod. (2007)
469	SSR-IAC083	(TC)11	1: 2:	ACCGAGATGAGCGTAGGAATG AGTTGAGAAGGCGCAGTTGTTA	45	286	Benchimol in sod. (2007)
470	SSR-IAC088	(CA)7 (AT)7	1: 2:	TTCTTGGGTGCTCGCTACTTA GTTTGGGATCTCGGGACCTT	60	274	Benchimol in sod. (2007)
471	SSR-IAC090	(CT)5 (TC)6 e (CA)4 (TA)6	1: 2:	GCACATTCTTCTCCCTCCTAA GCGTGGCCCTATTTTCATT	60	257	Benchimol in sod. (2007)
472	SSR-IAC091	(AC)3 (TC)2	1: 2:	AACCGCAAAGAGACACCA TGCAGGCTACACAAACACA	60	196	Benchimol in sod. (2007)
473	SSR-IAC092	(AC)6	1: 2:	GATAATCAGGGTCAAAGGTT GTGGACAGGGACATAATCTAAT	60	211	Benchimol in sod. (2007)
474	SSR-IAC093	(AC)5	1: 2:	AGTTCGCCTTGGATTCTA GGATTTTGTCTGCCTTACC	60	251	Benchimol in sod. (2007)
475	SSR-IAC097	(AC)3 (TC)2	1: 2:	AACTTCATGCATCTTCTTTATT GTGTTGTGGCTGCTGTCA	60	244	Benchimol in sod. (2007)
476	SSR-IAC100	(AT)4 (GT)8	1: 2:	GTAAACCGCAAAGAGACACC TGCAGGCTACACAAACACA	60	274	Benchimol in sod. (2007)
477	SSR-IAC102	(TAA)20(GAA)11	1: 2:	GGTGTTTCTGCCTCCACTG GCTAATGCTGCACACCAAACCT	60	201	Benchimol in sod. (2007)

PRILOGA C

Seznam do sedaj znanih in potencialnih genov akvaporinov navadnega fižola.

Appendix C: List of known aquaporin and putative aquaporin genes.

Št.	Ime gena	Lokus	Vir
1	<i>PvNIP1;1</i>	Phvul.006G170900.1	Phytozome
2	<i>PvNIP1;2</i>	Phvul.006G171000.1	Phytozome
3	<i>PvNIP1;3</i>	Phvul.002G242200.1	Phytozome
4	<i>PvNIP1;4</i>	Phvul.002G242300.1	Phytozome
5	<i>PvNIP2;1</i>	Phvul.008G041100.1	Phytozome
6	<i>PvNIP4;1</i>	Phvul.002G093700.1	Phytozome
7	<i>PvNIP5;1</i>	Phvul.007G084000.1	Phytozome
8	<i>PvNIP6;1</i>	Phvul.005G182400.1	Phytozome
9	<i>PvNIP6;2</i>	Phvul.010G160200.1	Phytozome
10	<i>PvNIP7;1</i>	Phvul.007G178300.1	Phytozome
11	<i>PvPIP1;1</i>	Phvul.001G241200.1	Phytozome
12	<i>PvPIP1;2</i>	Phvul.008G226000.1	Phytozome
13	<i>PvPIP1;3</i>	Phvul.002G290400.1	Phytozome
14	<i>PvPIP1;4</i>	Phvul.008G106400.1	Phytozome
15	<i>PvPIP1;5</i>	Phvul.010G004500.1	Phytozome
16	<i>PvPIP2;1</i>	Phvul.004G082600.1	Phytozome
17	<i>PvPIP2;2</i>	Phvul.004G082700.1	Phytozome
18	<i>PvPIP2;3</i>	Phvul.007G094600.1	Phytozome
19	<i>PvPIP2;4</i>	Phvul.005G135300.1	Phytozome
20	<i>PvPIP2;5</i>	Phvul.011G079300.1	Phytozome
21	<i>PvPIP2;6</i>	Phvul.001G177000.1	Phytozome
22	<i>PvPIP2;7</i>	Phvul.009G118900.1	Phytozome
23	<i>PvSIP1;1</i>	Phvul.001G097000.1	Phytozome
24	<i>PvSIP1;2</i>	Phvul.004G077700.1	Phytozome
25	<i>PvSIP1;3</i>	Phvul.011G102700.1	Phytozome
26	<i>PvSIP2;1</i>	Phvul.001G108800.1	Phytozome
27	<i>PvTIP1;1</i>	Phvul.001G181100.1	Phytozome
28	<i>PvTIP1;2</i>	Phvul.007G010800.1	Phytozome
29	<i>PvTIP1;3</i>	Phvul.008G014900.1	Phytozome
30	<i>PvTIP1;4</i>	Phvul.011G067200.1	Phytozome
31	<i>PvTIP1;5</i>	Phvul.005G141100.1	Phytozome
32	<i>PvTIP1;6</i>	Phvul.007G151600.1	Phytozome
33	<i>PvTIP2;1</i>	Phvul.005G170300.1	Phytozome
34	<i>PvTIP2;2</i>	Phvul.010G147100.1	Phytozome
35	<i>PvTIP2;3</i>	Phvul.002G057500.1	Phytozome
36	<i>PvTIP3;1</i>	Phvul.004G136000.1	Phytozome

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge C.

Št.	Ime gena	Lokus	Vir
37	<i>PvTIP3;2</i>	Phvul.001G080300.1	Phytozome
38	<i>PvTIP4;1</i>	Phvul.009G108800.1	Phytozome
39	<i>PvTIP5;1</i>	Phvul.011G015200.1	Phytozome
40	<i>PvXIP1;1</i>	Phvul.011G025700.1	Phytozome
41	<i>PvXIP1;2</i>	Phvul.011G025800.1	Phytozome
42	<i>PvTIP2;3*</i>	AQP Phv-1 (DQ087217)	GenBank
43		AQP Phv-2	GenBank
44	<i>PvTIP2;3*</i>	AQP Phv-3 (DQ087218)	GenBank
45	<i>PvTIP1;3*</i>	AQP Phv-4 (AY995196)	GenBank
46	<i>PvPIP2;5*</i>	AQP Phv-5 (AY995195)	GenBank
47		Put TIP-type alpha Phv	GenBank
48		PIP-type 7a-like prot Phv	GenBank
49		PIP 2 Phv	GenBank
50		TIP-type alpha-like prot Phv	GenBank
51		Put PIP2;3 Phv	GenBank
52		Put PIP2;2 Phv	GenBank
53		Prob TIP-type alpha	GenBank
54		Put MIP-1	GenBank
		PV PIP2-3 ABU94631	
		PV aqp1 AAB72149	

PRILOGA D

Podatki fenoloških in fizioloških parametrov ter vrednotenja pridelka RIL navadnega fižola.

Appendix D: Phenological, physiological, and yield data of common bean RILs.

Št.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Lastnost	Št. dni do cvetenja		Št. dni do strokov		Št.stroko v na rastlino		Št. semen na strok		Masa 100 semen		Vodni potencial – kontrola		Vodni potencial – suša 1		Vodni potencial – suša 2		Učinkovitost fotosintetskega aparata – kontrola		Učinkovitost fotosintetskega aparata – suša 1		Učinkovitost fotosintetskega aparata – suša 2		Stopnja prehajanja elektronov – kontrola		Stopnja prehajanja elektronov – suša 1		Stopnja prehajanja elektronov – suša 2	
Oznaka	DC		DStr		StrR		SeStr		M100Se		VP-K		VP-S1		VP-S2		Fv'/Fm'-K		Fv'/Fm'-S1		Fv'/Fm'-S2		ETR-K		ETR-S1		ETR-S2	
Pokus	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS
RIL 01	40	27	52	32	1,0 ₈	3,36	2,31	3,16	26,8 ₇	35,3 ₈	0,1 ₈	4,3 ₆	0,4 ₇	1,9 ₅	1,4 ₀	0,9 ₅	0,77	0,72	0,55	0,44	0,61	0,61	8,57	17,4 ₈	4,39	9,03	4,00	19,2 ₄
RIL 02	40	26	54	32	0,7 ₅	4,25	2,33	2,44	28,4 ₃	35,6 ₆	0,2 ₃	5,6 ₂	0,4 ₇	1,6 ₀	1,8 ₅	1,0 ₀	0,76	0,72	0,57	0,40	0,61	0,63	7,97	19,6 ₁	5,16	9,58	1,90	30,3 ₈
RIL 03		27		33	0,0 ₀	3,92	,00	1,81		43,8 ₇	0,1 ₈	5,4 ₉	0,3 ₃	3,0 ₀	1,4 ₅	0,9 ₀	0,65	0,77	0,71	0,58	0,71	0,55	8,47	16,0 ₃	6,14	8,34	3,81	11,8 ₃
RIL 04	40	26	52	30	1,0 ₀	2,67	1,58	4,00	21,4 ₇	35,2 ₇	0,1 ₂	7,4 ₈	0,4 ₇	1,1 ₃	1,6 ₇	1,1 ₅	0,63	0,76	0,67	0,55	0,56	0,75	10,5 ₇	28,4 ₇	6,78	15,7 ₈	5,16	14,4 ₁
RIL 05	38	23	54	26	0,8 ₃	6,00	1,70	2,69	27,8 ₂	29,3 ₁	0,2 ₀	7,2 ₅	0,2 ₅	1,2 ₈	1,5 ₀	0,7 ₀	0,68	0,77	0,69	0,41	0,39	0,73	9,23	33,8 ₈	7,19	11,4 ₄	3,93	31,7 ₂
RIL 06	40	27	54	32	0,1 ₇	5,67	1,50	2,26	38,6 ₇	40,1 ₀	0,2 ₈	6,1 ₈	0,3 ₂	1,6 ₅	1,3 ₀	1,0 ₅	0,71	0,76	0,67	0,37	0,57	0,60	12,3 ₃	23,9 ₅	9,38	11,7 ₆	5,47	21,5 ₃
RIL 07	38	24	55	27	0,8 ₃	4,75	1,30	2,06	38,5 ₄	42,2 ₇	0,2 ₂	5,6 ₂	0,2 ₈	1,9 ₀	1,8 ₅	0,9 ₀	0,66	0,77	0,59	0,26	0,73	0,67	14,1 ₇	23,2 ₈	5,62	9,23	6,28	27,1 ₉
RIL 08	40	25	52	29	0,9 ₂	3,33	2,82	3,00	22,5 ₅	34,2 ₄	0,2 ₀	5,0 ₇	0,3 ₇	1,3 ₅	1,4 ₅	0,9 ₅	0,77	0,76	0,66	0,49	0,71	0,65	5,43	25,7 ₇	9,11	15,8 ₈	7,56	25,2 ₅

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge D.

Št.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Ozn. last.	DC		DStr		StrR		SeStr		M100Se		VP-K		VP-S1		VP-S2		Fv'/Fm'-K		Fv'/Fm'-S1		Fv'/Fm'-S2		ETR-K		ETR-S1		ETR-S2	
Po-skus	BF	KI S	BF	KI S	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KI S	BF	KI S	BF	KI S	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS
RIL 09	40	24	52	29	1,0 9	2,83	1,92	3,17	33,1 1	199,00	0,1 2	5,8 7	0,3 5	2,3 0	1,1 3	0,7 5	0,59	0,76	0,66	0,18	0,57	,00	13,9 7	25,7 8	10,4 4	4,37	5,30	,00
RIL 10	38	25	52	31	0,5 8	3,08	1,14	1,90	32,1 5	35,6 6	0,1 3	4,9 8	0,2 3	2,0 0	2,9 5	0,9 0	0,57	0,77	0,57	0,41	0,59	0,63	11,3 0	24,3 2	9,96	13,1 8	5,16	16,6 9
RIL 12	38		54		1,0 0	,00	1,42	,00		199,00	0,1 0	0,0 0	0,2 2	0,0 0	2,5 5	0,0 0	0,65	,00	0,58	,00	0,55	,00	6,27	,00	11,1 3	,00	5,02	,00
RIL 13	38	24	54	29	0,5 8	3,33	1,29	2,56	39,8 0	35,6 6	0,1 2	7,5 9	0,2 7	1,7 0	2,8 0	1,1 5	0,72	0,77	0,64	0,36	0,55	0,72	8,78	16,2 4	8,87	9,86	4,60	14,6 9
RIL 14	38	26	54	30	0,3 3	2,50	2,75	3,48	31,7 8	199,00	0,1 3	5,4 1	0,2 7	1,9 8	1,6 5	0,8 0	0,65	0,78	0,65	0,47	0,71	0,71	8,13	16,9 6	7,58	10,4 7	6,01	14,0 5
RIL 15	40	28	56	33	0,0 0	8,75	,00	1,16	31,5 4	35,6 6	0,1 3	4,1 5	0,1 7	2,2 0	3,0 0	3,0 0	0,68	0,77	0,67	0,55	0,69	0,28	9,07	20,1 8	9,96	8,24	6,52	7,87
RIL 16					0,0 0	,00	,00	,00		199,00	0,1 5	0,0 0	0,1 7	0,0 0	1,4 7	0,0 0	0,59	,00	0,70	,00	0,64	,00	7,83	,00	10,1 3	,00	5,74	,00
RIL 17	38	25	52	28	1,0 0	3,42	2,25	2,76	28,0 4	35,6 6	0,0 8	6,1 5	0,3 0	1,8 0	1,3 8	0,7 5	0,72	0,77	0,63	0,36	0,59	0,70	11,4 7	22,3 8	8,67	11,2 8	6,26	15,1 8
RIL 18		30		37	0,0 0	4,64	,00	2,55	26,3 1	199,00	0,2 2	5,0 0	0,2 0	1,6 0	1,7 8	1,6 0	0,66	0,75	0,63	0,51	0,66	0,69	8,40	19,6 3	6,34	8,22	6,63	15,5 7
RIL 19	38	26	56	34	0,1 7	2,83	1,00	2,85	21,9 1	35,6 6	0,3 3	6,3 2	0,5 8	2,6 5	1,8 7	1,4 0	0,67	0,76	0,61	0,32	0,62	0,38	7,80	24,2 8	5,91	18,8 5	4,82	16,7 6
RIL 20	40	24	54	31	1,2 0	5,25	1,75	3,48	32,3 6	199,00	0,2 2	5,5 7	0,2 7	1,4 5	1,5 3	0,9 5	0,72	0,79	0,60	0,30	0,70	0,68	11,4 7	28,0 6	7,28	9,19	5,78	21,8 3
RIL 21	40	27	54	32	0,8 3	5,50	2,30	3,17	33,4 6	35,6 6	0,1 0	5,4 6	0,4 2	1,4 5	2,1 7	1,2 0	0,66	0,71	0,67	0,28	0,71	0,72	8,40	35,4 3	7,82	8,68	5,51	19,1 8

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge D.

Št.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Ozn. last.	DC		DStr		StrR		SeStr		M100Se		VP-K		VP-S1		VP-S2		Fv'/Fm'-K		Fv'/Fm'-S1		Fv'/Fm'-S2		ETR-K		ETR-S1		ETR-S2	
Po-skus	BF	KI S	BF	KI S	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KI S	BF	KI S	BF	KI S	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS
RIL 22		26		34	0,0 0	4,91	,00	1,32		37,1 8	0,2 0	8,1 9	0,6 2	2,5 0	1,3 3	3,0 0	0,67	0,78	0,71	0,34	0,67	0,35	7,80	21,5 9	7,36	21,2 5	4,54	18,9 0
RIL 24	38	26	54	30	0,5 0	4,18	1,83	3,04	32,7 3	43,1 6	0,1 5	5,7 0	0,2 8	4,0 0	2,5 0	0,9 0	0,71	0,75	0,73	0,42	0,72	0,65	8,07	37,1 8	4,02	13,1 8	4,17	19,9 8
RIL 25	45	27	59	33	0,0 8	3,25	1,00	2,96	40,0 0	34,1 0	0,1 7	6,0 7	0,4 7	1,7 5	1,9 7	1,4 5	0,66	0,70	0,64	0,43	0,72	0,73	11,2 3	43,8 5	3,39	14,2 7	4,03	26,1 7
RIL 26		29		34	0,0 0	3,25	,00	2,25		27,2 5	0,2 5	6,7 2	0,2 3	1,7 0	1,6 0	2,5 0	0,70	0,78	0,63	0,44	0,70	0,31	12,8 7	18,0 8	3,94	9,60	5,49	16,5 9
RIL 27	40	24	54	30	0,3 3	6,09	1,25	3,23	22,8 0	14,9 8	0,2 0	6,6 0	0,2 3	2,1 5	0,6 3	1,5 0	0,70	0,77	0,68	0,35	0,71	0,64	8,80	20,4 1	5,11	10,6 0	5,88	25,3 3
RIL 28	40	25	54	30	0,2 5	7,25	1,33	2,16	26,2 5	36,3 4	0,1 5	5,9 2	0,3 5	1,8 5	0,8 8	1,0 0	0,76	0,74	0,70	0,29	0,70	0,68	7,73	25,1 0	4,09	9,90	5,89	28,5 3
RIL 29	40		54		0,0 8	,00	1,00	,00	54,0 0		0,1 5	0,0 0	0,1 0	0,0 0	2,6 0	0,0 0	0,66	,00	0,74	,00	0,73	,00	12,6 3	,00	4,17	,00	5,19	,00
RIL 30	40	26	54		0,8 2	8,33	1,67	1,75	31,1 3	31,9 3	0,2 0	0,0 0	0,2 5	0,0 0	1,7 7	0,0 0	0,67	0,81	0,72	0,74	0,60	0,57	9,33	14,6 9	4,11	12,7 1	5,11	22,7 8
RIL 31	38	25	54	32	0,6 7	2,92	2,75	2,97	25,1 8	32,6 9	0,1 8	5,3 7	0,3 2	3,0 0	1,7 3	1,2 0	0,72	0,76	0,70	0,38	0,69	0,79	10,0 7	17,7 9	4,74	12,4 4	5,44	22,9 8
RIL 32	40	26	54	32	0,7 5	4,00	1,00	2,35	24,5 6	30,0 5	0,2 0	7,4 3	0,3 5	1,9 3	2,0 3	1,1 5	0,70	0,75	0,70	0,34	0,72	0,75	13,6 3	22,4 9	3,98	9,71	6,18	19,1 8
RIL 33	38	25	48	30	1,5 0	3,50	1,93	2,48	27,4 8	42,9 7	0,1 8	6,9 4	0,2 5	1,3 0	2,1 0	0,7 5	0,69	0,76	0,68	0,43	0,71	0,53	9,67	26,1 2	4,97	13,6 1	5,88	30,8 1
RIL 34	40	25	54	30	1,3 3	4,56	1,31	2,11	20,3 8	35,0 0	0,1 3	7,7 7	0,2 3	2,6 0	1,6 0	0,0 0	0,69	0,76	0,69	0,54	0,72	0,60	10,1 3	19,1 1	6,79	15,8 9	5,79	19,0 5

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge D.

Št.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Ozn. last.	DC		DStr		StrR		SeStr		M100Se		VP-K		VP-S1		VP-S2		Fv'/Fm'-K		Fv'/Fm'-S1		Fv'/Fm'-S2		ETR-K		ETR-S1		ETR-S2	
Po-skus	BF	KI S	BF	KI S	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KI S	BF	KI S	BF	KI S	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS
RIL 35	38	25	54	30	0,8 3	4,58	2,10	2,29	23,0 0	47,3 9	0,1 0	6,5 2	0,3 8	1,8 5	1,3 8	1,5 0	0,71	0,77	0,70	0,36	0,63	0,76	14,2 0	24,2 6	6,79	10,8 0	5,49	24,0 3
RIL 36	38	25	54	30	2,0 0	3,00	1,00	2,21	24,4 5	43,8 2	0,1 8	7,3 0	0,2 2	2,1 8	1,7 0	1,2 5	0,73	0,79	0,68	0,36	0,70	0,73	21,1 0	21,2 4	7,09	10,0 3	6,16	25,2 6
RIL 37	40	25	54	31	1,0 0	4,92	0,17	2,05	48,0 0	51,4 9	0,2 0	6,5 9	0,5 0	2,3 5	2,2 5	0,9 5	0,66	0,78	0,57	0,39	0,61	0,72	12,9 7	15,4 9	4,44	12,1 1	6,89	23,1 2
RIL 38	40	29		35	0,0 0	4,00	,00	3,17		28,5 1	0,1 7	6,3 1	0,3 8	1,7 0	2,2 8	1,2 5	0,73	0,81	0,68	0,67	0,60	0,50	13,1 3	12,9 1	7,07	8,46	6,99	16,7 5
RIL 39	38	25	54	31	0,8 3	1,75	2,10	3,00	29,7 1	38,5 0	0,2 2	5,9 2	0,2 5	3,0 0	2,0 0	0,7 0	0,71	0,78	0,66	0,57	0,73	0,77	14,4 0	18,9 2	5,86	16,5 8	9,84	27,8 5
RIL 40	40	26	54	30	0,5 8	5,27	1,86	3,56	24,4 6	36,9 0	0,1 8	2,7 0	0,3 2	1,5 8	2,4 8	1,3 0	0,64	0,70	0,64	0,54	0,71	0,78	13,6 7	18,3 8	5,73	15,6 4	8,93	27,7 0
RIL 41		29		36	0,0 0	4,33	,00	2,84		27,8 5	0,1 3	4,9 7	0,3 2	3,0 0	2,6 5	0,9 0	0,73	0,78	0,69	0,62	0,67	0,54	20,1 7	13,1 7	5,03	7,72	3,93	13,1 6
RIL 42	38	26	52	29	1,2 5	4,00	1,53	2,92	26,2 2	43,3 3	0,1 0	5,9 0	0,3 0	1,5 0	2,6 8	1,0 0	0,73	0,81	0,58	0,47	0,71	0,74	16,5 0	24,0 5	3,31	14,6 5	4,06	21,2 2
RIL 44	40	26	54	33	0,3 3	3,75	1,25	3,30	28,2 0	33,1 9	0,1 8	6,0 2	0,4 2	1,9 5	2,6 7	1,4 5	0,72	0,76	0,65	0,44	0,65	0,64	8,87	22,1 1	3,77	16,1 9	7,63	17,7 9
RIL 45	40	25	54	29	1,0 8	5,08	0,46	1,97	34,0 0	41,8 1	0,1 2	5,6 3	0,4 2	2,0 0	1,3 5	1,5 0	0,69	0,76	0,71	0,45	0,53	0,54	8,97	24,8 7	8,98	10,8 9	6,58	13,1 8
RIL 46	40		54	37	0,1 0	,00	1,00	,00	39,0 0		0,0 8	6,7 8	0,4 0	0,0 0	0,5 2	0,0 0	0,70	0,75	0,69	,00	0,73	,00	9,27	21,5 6	10,8 0	,00	7,27	,00
RIL 47		29		37	0,0 0	6,18	,00	2,54		34,3 1	0,2 0	7,4 8	0,2 3	2,3 5	1,8 5	1,3 5	0,73	0,76	0,61	0,47	0,63	0,80	12,2 3	26,7 9	3,50	9,20	6,56	26,9 0

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge D.

Št.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Ozn. last.	DC		DStr		StrR		SeStr		M100Se		VP-K		VP-S1		VP-S2		Fv'/Fm'-K		Fv'/Fm'-S1		Fv'/Fm'-S2		ETR-K		ETR-S1		ETR-S2	
Po-skus	BF	KI S	BF	KI S	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KI S	BF	KI S	BF	KI S	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS
RIL 48	38	27		32	0,0 0	5,00	,00	2,27		42,4 2	0,1 7	7,0 6	0,2 8	1,6 0	1,5 3	1,7 0	0,61	0,79	0,61	0,62	0,58	0,55	13,4 3	14,7 4	4,83	8,62	6,39	24,5 9
RIL 50	40	26	54	31	0,7 5	5,17	1,56	2,16	29,5 0	41,0 0	0,2 5	7,6 0	0,4 3	1,5 8	2,5 0	1,0 0	,00	0,73	,00	0,55	,00	0,58	,00	32,4 3	,00	10,7 8	,00	18,9 9
RIL 53	38	25	54	30	1,0 0	4,58	1,67	2,41	32,3 5	47,3 0	0,1 8	6,7 7	0,4 7	2,2 0	2,5 3	1,3 5	0,76	0,73	0,65	0,49	0,51	0,59	14,8 3	20,2 2	5,39	12,2 4	7,11	25,6 1
RIL 54	38	26	54	31	0,3 3	3,17	1,25	2,27	39,8 0	38,0 2	0,1 3	7,0 0	0,4 7	1,4 5	1,7 2	1,4 5	0,75	0,68	0,61	0,52	0,63	0,69	10,8 7	18,7 1	3,32	15,3 1	6,14	33,5 9
RIL 55	38	25	54	29	1,1 7	3,75	1,86	2,73	22,6 2	39,2 3	0,1 7	7,3 0	0,7 0	1,9 0	1,5 5	0,7 0	0,74	0,80	0,64	0,31	0,65	0,73	11,4 3	20,5 5	6,36	6,99	8,37	37,5 3
RIL 56		29		37	0,0 0	3,83	,00	2,90		24,9 8	0,1 3	6,3 8	0,8 5	2,3 5	1,7 3	1,3 5	0,69	0,74	0,66	0,63	0,62	0,50	22,1 7	26,5 2	5,60	10,8 2	5,77	13,8 2
RIL 57	38	27	54	30	0,8 0	3,58	1,38	2,58	35,1 8	36,3 6	0,1 7	6,6 9	0,5 0	1,9 0	1,6 3	1,2 5	0,70	0,78	0,67	0,44	0,67	0,66	21,3 7	23,2 6	10,4 7	14,1 4	6,93	26,0 8
RIL 58	40	26	52	30	1,4 0	4,00	1,43	2,74	27,4 0	50,2 0	0,1 0	6,7 3	0,2 5	2,1 0	0,5 7	1,2 5	0,69	0,74	0,71	0,55	0,74	0,74	22,5 0	23,9 7	9,12	18,4 7	6,69	22,9 3
RIL 59	38	27	52	31	1,0 8	3,83	2,54	3,20	23,2 7	43,3 2	0,1 3	5,2 8	0,5 5	1,2 5	1,2 3	0,9 0	0,75	0,77	0,71	0,45	0,55	0,72	14,2 3	28,1 0	3,92	9,93	5,12	24,6 6
RIL 61				36	0,2 0	0,33	1,50	1,75	18,3 3	40,2 9	0,1 0	6,7 7	0,3 3	0,0 0	0,9 5	0,0 0	0,71	0,70	0,69	0,82	0,59	0,60	12,3 0	29,7 4	6,33	6,96	6,49	17,8 8
RIL 62	38	27		32	0,0 0	5,83	,00	2,46		30,0 6	0,1 0	7,9 1	0,8 2	2,7 0	2,1 0	1,2 0	0,75	0,75	0,71	0,58	0,67	0,56	17,0 0	30,7 5	8,86	9,31	9,30	19,7 2
RIL 63	45	26		36	0,0 8	4,20	2,00	3,06	33,5 0	36,6 3	0,1 2	6,5 2	1,1 2	1,6 0	1,2 3	0,8 5	0,71	0,80	0,69	0,40	0,56	0,74	20,1 7	24,1 5	3,32	13,0 7	6,10	23,1 0

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge D.

Št.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Ozn. last.	DC		DStr		StrR		SeStr		M100Se		VP-K		VP-S1		VP-S2		Fv'/Fm'-K		Fv'/Fm'-S1		Fv'/Fm'-S2		ETR-K		ETR-S1		ETR-S2	
Po-skus	BF	KI S	BF	KI S	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KI S	BF	KI S	BF	KI S	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS
RIL 65	45	27		35	0,0 0	7,00	,00	2,57		28,0 7	0,1 8	7,3 8	0,4 2	2,0 0	2,5 2	0,9 0	0,71	0,74	0,74	0,57	0,66	0,53	14,2 7	24,2 5	4,50	8,25	8,83	19,4 2
RIL 66	38	26	54	30	0,8 2	3,50	1,56	2,68	26,0 7	40,4 2	0,2 2	5,8 8	0,4 5	2,0 5	2,3 8	0,9 5	0,75	0,75	0,69	0,46	0,30	0,61	19,4 0	18,2 0	3,94	11,4 3	3,49	17,3 9
RIL 67	38	27	52	32	0,5 0	2,50	1,33	2,44	31,8 8	37,0 3	0,2 0	6,5 3	0,7 0	1,8 0	2,1 5	0,8 0	0,75	0,74	0,68	0,58	0,45	0,54	21,1 0	19,1 0	3,60	12,9 6	6,21	13,0 0
RIL 68	38	26	52	33	1,0 8	3,60	1,15	4,90	28,8 0	20,7 6	0,1 5	0,0 0	0,3 0	0,0 0	2,1 3	0,0 0	0,70	0,76	0,73	0,80	0,53	0,33	13,2 3	41,0 9	3,98	5,09	7,91	33,6 6
RIL 69	40	25	52	28	1,0 9	3,58	1,17	2,65	34,3 6	40,2 2	0,1 7	6,8 9	0,5 0	1,6 5	1,9 8	0,8 5	0,69	0,74	0,68	0,44	0,69	0,69	25,4 0	23,9 6	4,51	10,0 5	7,29	18,6 0
RIL 70	45	26	56	33	0,2 5	2,33	2,00	3,64	27,0 0	21,8 8	0,1 3	7,6 5	0,2 8	2,6 0	1,4 0	1,3 5	0,76	0,75	0,70	0,49	0,68	0,63	17,1 0	26,9 2	3,34	11,7 3	6,66	15,7 9
RIL 71	38	25	52	30	1,0 0	3,75	2,08	3,19	24,5 2	29,4 7	0,1 3	5,5 1	1,0 5	1,3 0	1,5 3	1,2 0	0,67	0,77	0,66	0,26	0,68	0,61	11,0 7	22,9 4	4,51	16,5 2	6,47	22,3 0
RIL 72	38	25	52	28	1,1 7	4,33	1,21	3,04	30,5 3	39,8 2	0,1 2	7,0 9	0,9 2	1,9 5	1,9 2	1,1 0	0,71	0,78	0,61	0,43	0,67	0,71	13,1 7	29,5 9	4,31	12,7 8	6,68	17,7 4
RIL 73	38	25	52	29	0,9 2	3,08	1,82	3,46	25,2 0	37,8 4	0,1 2	5,3 4	0,6 3	1,7 5	1,7 7	0,8 0	0,75	0,73	0,52	0,43	0,64	0,71	8,97	27,6 7	5,61	13,1 8	6,20	21,0 9
RIL 74	47	28	56	33	0,0 9	5,33	1,00	2,47	36,0 0	35,4 4	0,1 3	5,9 8	0,2 5	2,5 0	2,0 0	1,4 0	0,76	0,77	0,54	0,41	0,67	0,67	11,5 3	27,0 0	7,96	13,1 5	4,96	20,4 7
RIL 75	38	26	52	30	0,7 5	4,50	1,78	2,94	32,7 5	40,9 0	0,0 7	5,0 7	0,4 0	2,1 3	2,2 0	1,4 5	0,62	0,74	0,64	0,45	0,42	0,68	14,5 0	24,1 6	5,41	7,96	2,04	22,9 6
RIL 76	40	26	52	31	0,7 3	3,92	0,38	1,52	15,3 3	46,6 9	0,1 2	5,8 7	0,3 0	2,5 0	1,8 7	1,2 0	0,62	0,78	0,63	0,36	0,73	0,73	14,0 7	17,4 6	6,09	10,0 4	3,03	22,0 5

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge D.

Št.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Ozn. last.	DC		DStr		StrR		SeStr		M100Se		VP-K		VP-S1		VP-S2		Fv'/Fm'-K		Fv'/Fm'-S1		Fv'/Fm'-S2		ETR-K		ETR-S1		ETR-S2	
Po-skus	BF	KI S	BF	KI S	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KI S	BF	KI S	BF	KI S	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS
RIL 77		29		33	0,2 0	3,58	1,00	3,26	29,5 0	29,5 7	0,1 2	6,4 5	0,5 2	2,8 0	1,8 3	0,7 0	0,70	0,78	0,61	0,56	0,72	0,36	12,6 7	17,9 6	5,28	10,7 9	3,32	11,0 6
RIL 78	38	25	54	31	0,4 2	4,25	1,00	2,53	21,6 0	42,5 5	0,1 2	9,1 3	0,4 7	2,4 0	1,8 5	1,3 0	0,64	0,73	0,64	0,39	0,62	0,73	11,3 0	22,8 9	6,77	56,3 8	3,28	23,2 3
RIL 79	38	26	52	30	1,2 5	3,58	1,67	3,48	22,5 6	37,8 4	0,2 0	6,0 5	0,2 3	0,9 0	1,9 5	0,6 0	0,76	0,78	0,71	0,48	0,18	0,64	29,5 5	22,1 6	7,39	49,3 7	1,02	19,1 1
RIL 80	45	28		36	0,0 0	3,00	,00	2,87		33,7 1	0,1 7	4,8 9	0,2 5	3,0 0	2,3 0	1,5 0	0,76	0,78	0,73	0,39	0,74	0,69	22,4 0	28,5 3	9,80	23,7 8	7,74	21,1 6
RIL 81	45	27		32	0,0 0	3,83	,00	1,89		40,3 1	0,1 8	5,8 1	0,2 8	2,2 0	3,1 5	1,5 0	0,72	0,73	0,71	0,45	0,64	0,52	15,7 3	29,6 4	9,62	31,6 6	11,1 0	16,6 9
RIL 82	40	28	54	30	0,5 5	4,33	0,33	2,18	6,00	39,7 4	0,1 5	7,7 5	0,2 5	3,0 0	2,5 2	1,2 0	0,75	0,73	0,77	0,46	0,67	0,67	16,0 5	26,8 8	8,13	29,6 8	13,8 4	24,3 2
RIL 83	38	24	54	28	0,4 2	3,25	1,00	2,66	35,6 0	44,8 3	0,1 2	7,3 5	0,3 3	2,1 0	2,4 7	7,3 0	0,76	0,77	0,72	0,41	0,66	0,56	20,5 0	23,5 9	8,59	17,5 5	9,54	20,2 0
RIL 84	38	25	54	30	1,2 5	2,18	2,07	2,56	26,5 8	33,2 2	0,1 3	9,1 4	0,7 2	2,9 0	2,8 5	1,2 5	0,67	0,78	0,75	0,34	0,68	0,39	8,70	20,2 8	9,30	12,4 0	10,2 4	19,2 5
RIL 85	38	25	56	31	0,5 0	4,83	1,83	2,71	20,5 5	27,1 3	0,1 8	6,8 6	0,2 0	1,7 0	2,8 3	1,0 5	0,76	0,74	0,78	0,38	0,37	0,50	28,3 5	23,4 5	8,16	22,4 4	6,76	21,4 7
RIL 86	38	24	56	28	1,0 0	3,75	0,67	2,50	14,5 0	36,5 7	0,1 3	7,8 4	0,1 8	1,8 0	2,4 8	1,2 0	0,76	0,74	0,76	0,28	0,36	0,43	26,6 5	22,2 3	7,24	9,30	7,10	18,5 4
RIL 88	38	27	54	32	0,4 2	3,17	1,40	3,33	35,5 7	31,4 7	0,1 5	6,9 8	0,6 0	3,0 0	3,3 3	1,7 0	0,72	0,71	0,75	0,43	0,26	0,34	23,8 5	22,3 0	6,81	12,0 7	3,93	13,9 3
RIL 89	38	26	56	30	0,5 8	4,83	1,43	2,53	21,7 0	34,3 6	0,1 7	8,8 1	0,3 0	1,8 5	2,7 5	3,0 0	0,75	0,72	0,75	0,36	0,73	0,52	0,75	35,0 8	6,28	14,0 5	14,5 9	20,1 4

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge D.

Št.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Ozn. last.	DC		DStr		StrR		SeStr		M100Se		VP-K		VP-S1		VP-S2		Fv'/Fm'-K		Fv'/Fm'-S1		Fv'/Fm'-S2		ETR-K		ETR-S1		ETR-S2	
Po-skus	BF	KI S	BF	KI S	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KI S	BF	KI S	BF	KI S	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS	BF	KIS
RIL 90	38	26	54	32	1,2 5	4,08	1,87	2,08	15,2 5	28,1 6	0,1 5	6,9 7	0,2 0	1,9 0	2,3 5	2,2 0	0,78	0,78	0,76	0,41	0,36	0,60	7,90	27,5 7	7,01	13,8 5	8,54	27,3 7
RIL 91	45	29		37	0,0 0	4,58	,00	2,89		40,2 0	0,1 7	5,2 3	0,4 2	2,1 0	2,8 7	1,0 5	0,75	0,74	0,72	0,42	0,60	0,50	11,0 0	19,5 7	3,94	8,41	6,20	18,5 4

PRILOGA E

Rezultati fizioloških parametrov navadnega fižola sorte 'Tiber' in sorte 'Starozagorski črn', merjenih pred sušo, v treh časovnih stopnjah suše in rehidraciji v poskusu IJS 2.

Appendix E: Results of physiological parameters measured on two common bean cultivars 'Tiber' and 'Starozagorski črn' before drought, at three time points of drought, and at rehydration in experiment IJS 2.

Obravnavanje			Parameter															
			Relativna vsebnost vode v listih (%)		Vodni potencial (MPa)		Stomatalna prevodnost ($\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$)		Transpiracija ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$)		Netofotosinteza ($\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)		Potencialna fotokemična učinkovitost		Hitrost transporta elektronov		Učinkovitost izrabe vode	
Sor-ta	Treti-ranje	Dan suše	$\bar{x} \pm \text{SE}$		$\bar{x} \pm \text{SE}$		$\bar{x} \pm \text{SE}$		$\bar{x} \pm \text{SE}$		$\bar{x} \pm \text{SE}$		$\bar{x} \pm \text{SE}$		$\bar{x} \pm \text{SE}$		$\bar{x} \pm \text{SE}$	
'Tiber'	K	0	99,87 ± 0,5	a	-0,18 ± 0,02	ab	0,05 ± 0,01	cd	0,69 ± 0,16	cdef	3,28 ± 0,82	bcd	0,81 ± 0	b	21,57 ± 2,39	de	4,56 ± 0,39	ab
		4	99,44 ± 0,56	a	-0,23 ± 0,04	ab	0,07 ± 0,01	bcd	1,34 ± 0,31	bcd	5,03 ± 0,84	ab	0,81 ± 0	bc	25,1 ± 1,62	bc	4,24 ± 0,60	ab
		7	92,66 ± 4,83	ab	-0,24 ± 0,02	ab	0,04 ± 0,01	cd	0,8 ± 0,12	bcde	1,33 ± 0,38	cde	0,8 ± 0	bc	20,68 ± 0,44	de	1,42 ± 0,41	cd
		11	97,33 ± 0,71	a	-0,2 ± 0	ab	0,03 ± 0	cd	0,49 ± 0,01	cdef	1,22 ± 0,33	cde	0,8 ± 0	bcd	17,6 ± 4,80	de	2,49 ± 0,62	bcd
		0	99,87 ± 0,5	a	-0,18 ± 0,02	ab	0,06 ± 0,01	cd	0,87 ± 0,08	cdef	4,18 ± 0,49	bcd	0,81 ± 0	bc	28,28 ± 1,16	ab	4,81 ± 0,31	ab
	S	4	97,26 ± 0,94	a	-0,46 ± 0,06	b	0,05 ± 0,01	cd	0,87 ± 0,14	bcdef	3,12 ± 0,74	bcd	0,81 ± 0	bc	20,72 ± 3,16	de	3,43 ± 0,38	abc d
		7	72,34 ± 8,76	c	-0,93 ± 0,18	c	0,01 ± 0	d	0,27 ± 0,03	def	-1,43 ± 0,06	f	0,79 ± 0	bcd	19,34 ± 2,09	cd	-5,6 ± 0,78	f
		11	16,76 ± 0,96	e	-2,8 ± 0,2	e							0 ± 0	f	0,05 ± 0,05	f		
		11	96,65 ± 1,75		-0,17 ± 0,04		0,02 ± 0,01		0,41 ± 0,15		-0,01 ± 0,38		0,77 ± 0,02		19,58 ± 0,79		-1,32 ± 1,19	
	R	11																

Se nadaljuje.

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

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

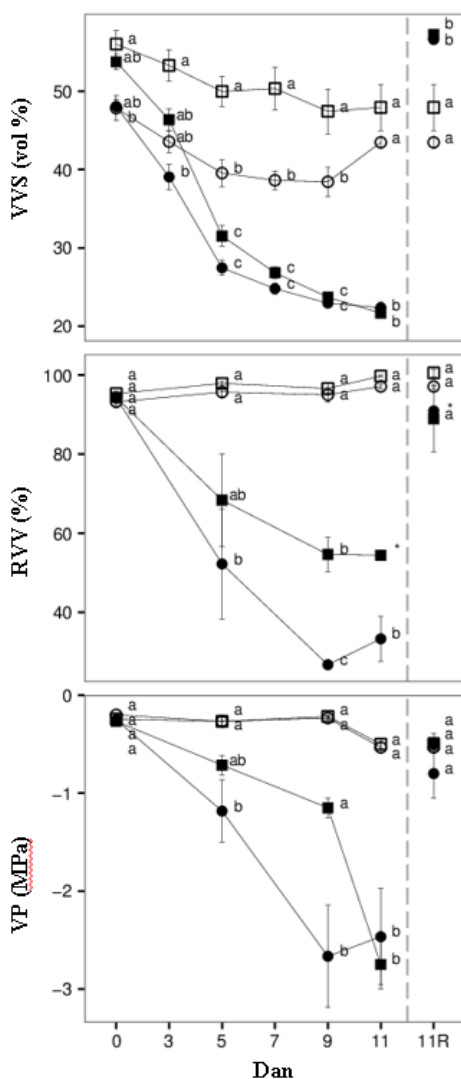
Obravnavanje			Parameter															
			Relativna vsebnost vode v listih (%)		Vodni potencial (MPa)		Stomatalna prevodnost ($\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$)		Transpiracija ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$)		Netofotosinteza ($\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)		Potencialna fotokemična učinkovitost		Hitrost transporta elektronov		Učinkovitost izrabe vode	
Sor-ta	Treti-ranje	Dan suše	$\bar{x} \pm \text{SE}$		$\bar{x} \pm \text{SE}$		$\bar{x} \pm \text{SE}$		$\bar{x} \pm \text{SE}$		$\bar{x} \pm \text{SE}$		$\bar{x} \pm \text{SE}$		$\bar{x} \pm \text{SE}$		$\bar{x} \pm \text{SE}$	
'Starozagorski čern'	K	0	97,88 ± 0,34	a	-0,16 ± 0,02	a	0,07 ± 0,02	cd	1,07 ± 0,23	cdef	4,71 ± 0,9	bc	0,8 ± 0	bc	24,36 ± 1,87	cd	4,65 ± 0,39	a
		4	99,13 ± 0,87	a	-0,27 ± 0,02	ab	0,13 ± 0,02	ab	2,1 ± 0,3	a	5 ± 0,17	cd	0,8 ± 0	cd	31,48 ± 0,91	ab	2,68 ± 0,37	d
		7	91,58 ± 2,63	ab	-0,25 ± 0,03	ab	0,09 ± 0,01	ab	1,61 ± 0,24	a	2,13 ± 0,11	cd	0,8 ± 0	bc	22,27 ± 2,27	cd	1,42 ± 0,19	d
		11	92,89 ± 0,94	ab	-0,22 ± 0,03	ab	0,07 ± 0,01	abc	1,03 ± 0,18	abc	1,48 ± 0,4	de	0,78 ± 0	d	21,37 ± 4,63	cd	1,71 ± 0,54	d
		0	97,88 ± 0,34	a	-0,16 ± 0,02	a	0,09 ± 0,01	a	1,34 ± 0,15	ab	5,61 ± 0,8	a	0,81 ± 0	b	33,18 ± 0,72	a	4,17 ± 0,29	abc
	S	4	83,4 ± 7,81	b	-0,77 ± 0,07	c	0,02 ± 0	d	0,34 ± 0,08	ef	0,66 ± 0,55	ef	0,81 ± 0	bc	19,93 ± 1,14	cd	0,06 ± 1,11	e
		7	33,73 ± 4,8	d	-1,62 ± 0,17	d	0,01 ± 0	d	0,18 ± 0,03	f	-1,17 ± 0,29	f	0,74 ± 0,01	e	13,62 ± 1,74	e	-8,68 ± 2,26	g
		11	14,01 ± 0,73	e	-3 ± 0	e	0,01		0,10		-1,59		0,01 ± 0,01	f	0 ± 0	f	-15,62	
		R	11	86,99 ± 3,71		-0,4 ± 0		0,07 ± 0,02		1,02 ± 0,15		1,75 ± 0		0,77 ± 0		26,25 ± 2,35		1,77 ± 0,27

PRILOGA F

Vsebnost vode v substratu (VVS), relativna vsebnost vode v listih (RVV) in vodni potencial (VP) rastlin navadnega fižola sorte 'Tiber' in 'Starozagorski črn' dan pred sušo (0. dan), med sušo (3.–11. dan) in v rehidraciji (11R) iz poskusa IJS 1 (Zupin in sod., 2017: 6). Sorta 'Tiber' je na grafu označena s kvadratom, sorta 'Starozagorski' pa s krogom. Prazni simboli predstavljajo kontrolne rastline, polni simboli pa rastline v suši. Prikazane so povprečne vrednosti treh ponovitev vzorcev s $\pm$ standardno napako. Z »*« so označeni vzorci, kjer je podan podatek za eno samo rastlino, ker so se ostale posušile.

Rezultati rehidriranih rastlin so desno, ločeni s črtkano črto. Različne male črke (a, b, c) označujejo značilne razlike med vzorci na določeni dan suše, ki so bile izračunane s testom ANOVA.

Appendix F: Soil water content (VVS), relative water content (RVV) and water potential (VP) of two common bean cultivars in control conditions, at the initiation of drought (day 0), during drought (day 3–11) and at rehydration (11R) from IJS 1 experiment (Zupin et al., 2017: 6). Cultivars are Tiber (square) and Starozagorski (circle). Open symbols represent control values and filled symbols represent treatment values. Data are means $\pm$ SE of 3 plants, exceptions where due to wilting only 1 plant remained are marked with *. Rehydration is separated by vertical dash line. Different letters (a, b, c) represent statistically significant differences on a given day, determined by ANOVA.

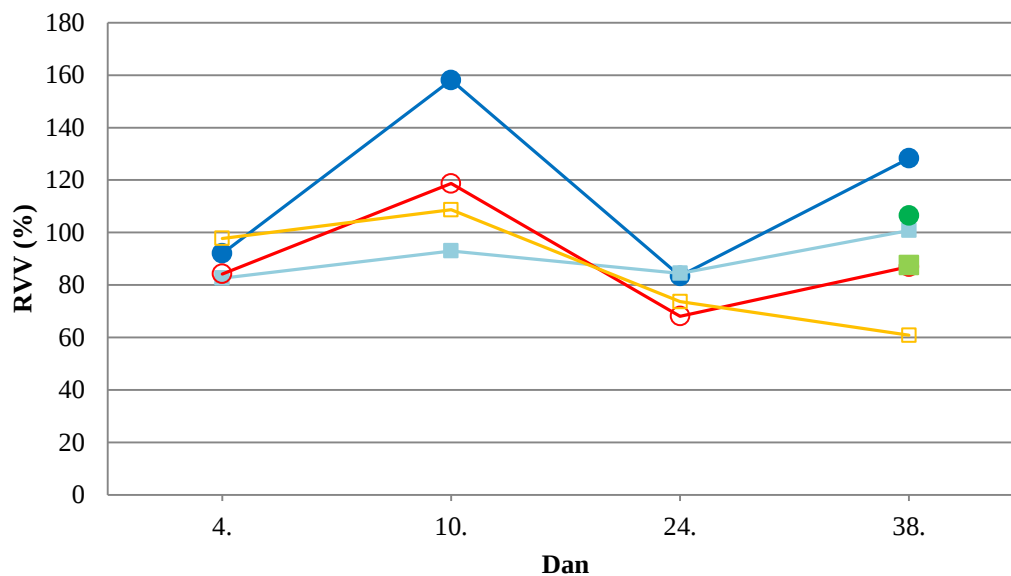


PRILOGA G

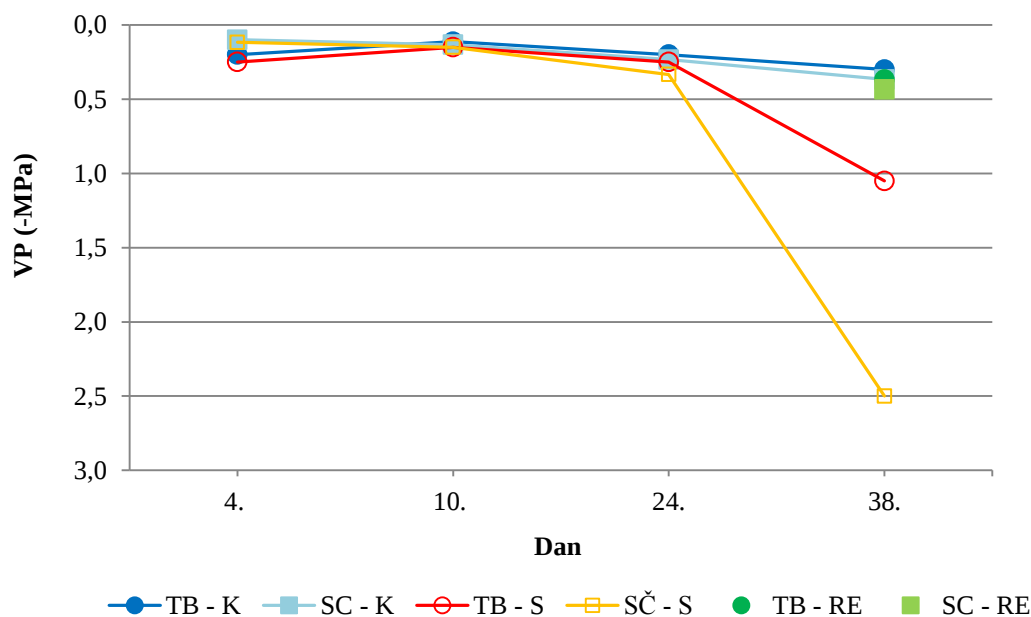
Relativna vsebnost vode v listih (RVV) (a) in vodni potencial (VP) (b) rastlin, izpostavljenih suši (S), ter kontrolnih rastlin (K) navadnega fižola sorte 'Tiber' (TB) in 'Starozagorski črn' (SČ) v štirih časovnih stopnjah suše (4., 10., 24. in 38. dan) in v rehidraciji (RE) iz poskusa BF_{SL}.

Appendix G: Relative water content (RVV) (a) and water potential (VP) (b) of control (K) and drought stressed common bean plants (S) of 'Tiber' (TB) and 'Starozagorski črn' (SČ) cultivars in four time-points of drought (day 4, 10, 24 and 38) and at rehydration (RE) from experiment BF_{SL}.

a)



b)

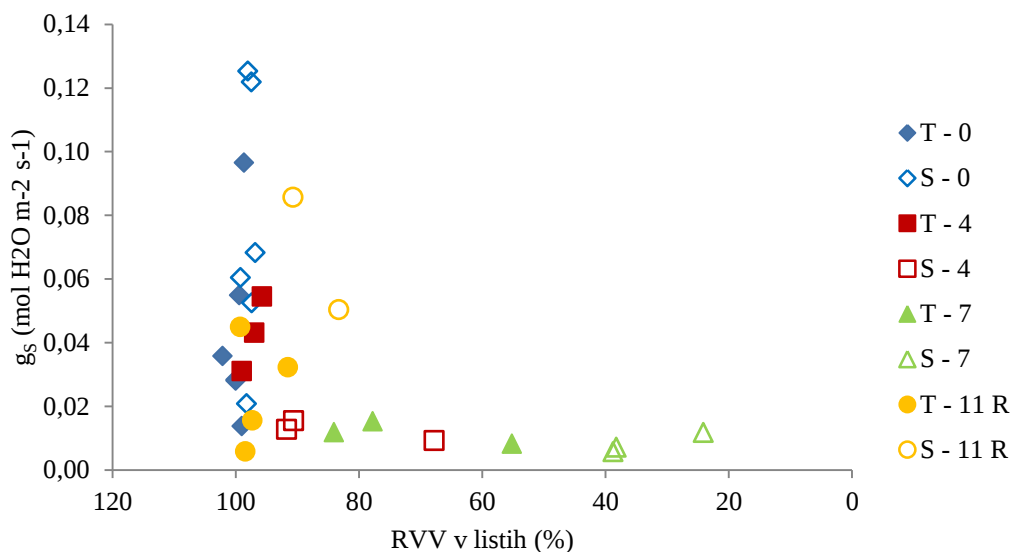


PRILOGA H

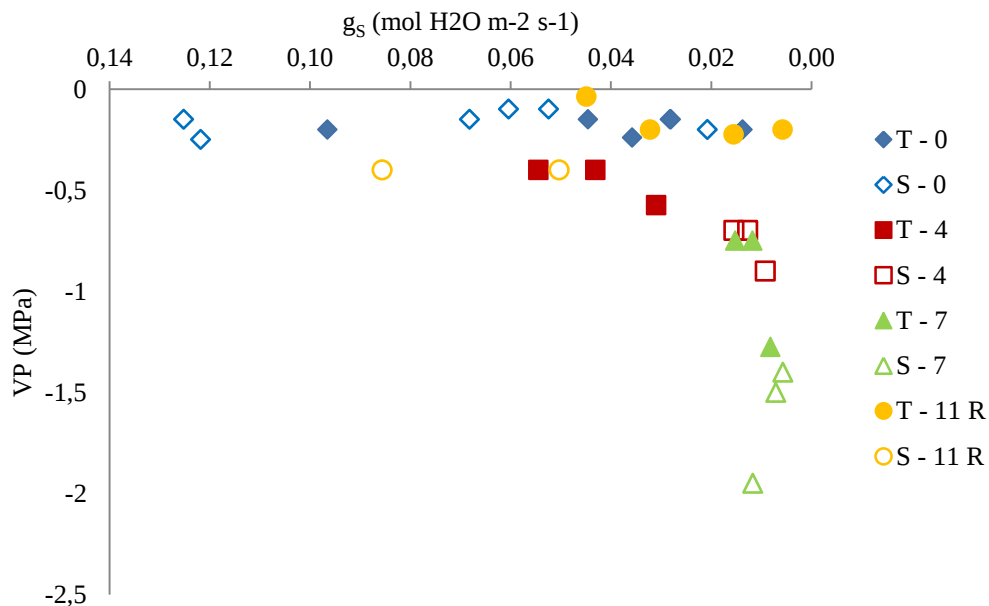
Vpliv relativne vsebnosti vode (RVV) v listih in vodnega potenciala (VP) na prevodnost listnih rež (g_s) ter povezava med g_s in netofotosintezo (A_N). Prikazani so rezultati meritev vseh 3–6 ponovitev na obravnavanje.

Appendix H: The impact of the relative water content (RVV) in the leaves and the water potential (VP) on the leaf stomata conductance (g_s) and the connection between the g_s and neto-photosynthesis (A_N). The results of measurements of 3-6 replicates per treatment.

a)



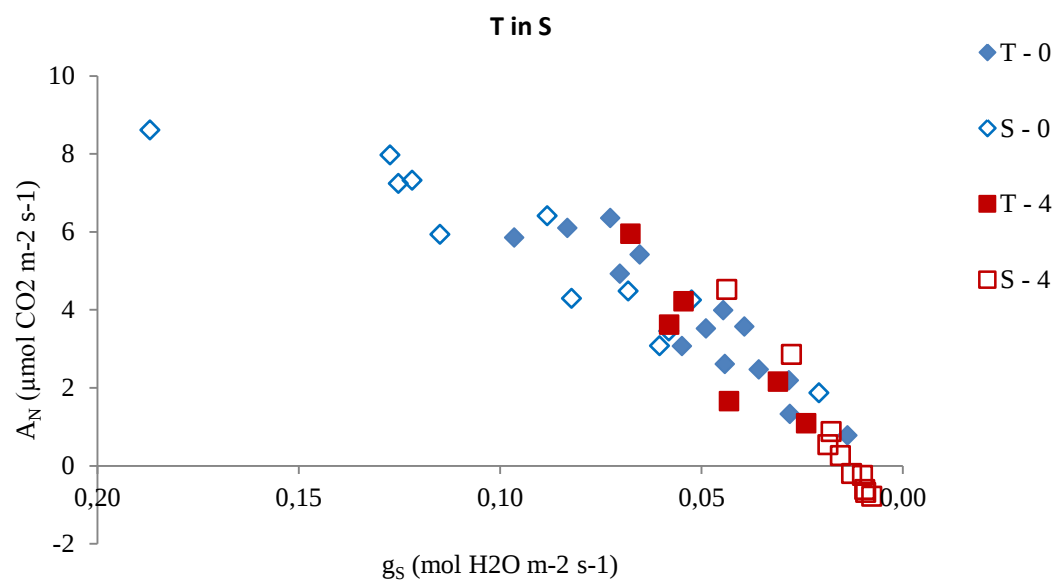
b)



Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge H.

c)



PRILOGA I

Seznam testiranih in polimorfnih kombinacij uporabljenih markerjev.
Appendix I: List of tested polymorphic markers.

Vrsta markerja	Število kombinacij	Polimorfna kombinacija	Število polimorfnih markerjev		Število markerjev
			'Tiber'	'Starozagorski'	
ISSR	1	LOL2	1	2	
	2	LOL3	1	2	
	3	LOL4		1	
	4	LOL5	2	2	
	5	LOL6	2		
	6	LOL7		1	
	7	LOL9	2		
	8	LOL10	1		
	9	LOL12	4	2	
	10	PHV2		2	
	11	PHV3	4	3	
	12	PHV4	2	3	
	13	PHV5	3	2	
	14	PHV6	3	3	
	15	PHV7	1	2	
	16	PHV8	1	1	53
RAPD	1	FAGR3		1	1
Semi random	1	FAGR16	2	2	
	2	FAGR17	1	2	
	3	FAGR21	1		
	4	FAGR24	2	1	11
SRAP-RGA	1	komb. 3	2	3	
	2	komb. 9		1	
	3	komb. 10		2	
	4	komb. 16	1	1	
	5	komb. 21	2	1	
	6	komb. 22	1	1	
	7	komb. 23	2	1	
	8	komb. 24	1	1	
	9	komb. 26			
	10	komb. 27			
	11	komb. 30	1	2	
	12	komb. 31	1		
	13	komb. 39	3	2	

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge I.

Vrsta markerja	Število kombinacij	Polimorfna kombinacija	Število polimorfnih markerjev		Število markerjev
			'Tiber'	'Starozagorski'	
	14	komb. 40		1	
	15	komb. 41	1		
	16	komb. 119	1		
	17	komb. 48	2	1	
	18	komb. 55		1	
	19	komb. 60	1		
	20	komb. 66	1		
	21	komb. 80		1	
	22	komb. 87	1		
	23	komb. 99		1	
	24	komb. 103	1		
	25	komb. 107	2	1	
	26	komb. 112		1	
	27	komb. 117	1		
	28	komb. 130	1		
	29	komb. 131	1		
	30	komb. 134	1		
	31	komb. 136		1	
	32	komb. 1		2	
	33	komb. 23	4	1	
	34	komb. 51	1	1	60
RGAP	1	komb. 1	1		
	2	komb. 2	1		
	3	komb. 3		1	
	4	komb. 4	3		
	5	komb. 8	1		
	6	komb. 10	3		
	7	komb. 11		1	
	8	komb. 13		1	
	9	komb. 14		2	
	10	komb. 21		1	
	11	komb. 22	3		
	12	komb. 23	2	1	
	13	komb. 30	1		
	14	komb. 32	1	1	
	15	komb. 38		1	
	16	komb. 40		1	
	17	komb. 41	1	3	
	18	komb. 43	1	2	

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge I.

Vrsta markerja	Število kombinacij	Polimorfna kombinacija	Število polimorfnih markerjev		Število markerjev
			'Tiber'	'Starozagorski'	
	19	komb. 44		4	
	20	komb. 45	2		
	21	komb. 53	1		
	22	komb. 55	1		
	23	komb. 56	3		
	24	komb. 60	1		
	25	komb. 62	1		
	26	komb. 68	2	1	49
SRAP					
	1	komb. 3		1	
	2	komb. 4		1	
	3	komb. 6		1	
	4	komb. 8	1	1	
	5	komb. 12		1	
	6	komb. 16		2	
	7	komb. 21	1	3	
	8	komb. 22		2	
	9	komb. 23	1		
	10	komb. 25		1	
	11	komb. 32	1		
	12	komb. 33	1		
	13	komb. 34	1		
	14	komb. 35	1	1	
	15	komb. 36	1		
	16	komb. 41	2	2	
	17	komb. 45	1		
	18	komb. 48	1		
	19	komb. 49		2	
	20	komb. 51	1	1	
	21	komb. 53	2	1	
	22	komb. 55		1	
	23	komb. 57		1	
	24	komb. 62	1		
	25	komb. 63		1	
	26	komb. 64		1	40
Vsota vseh markerjev					214

PRILOGA J

Seznam kombinacij začetnih oligonukleotidov akvaporinom podobnih sekvenc in njim najbolj podobnih že znanih sekvenc akvaporinov.

Appendix J: List of aquaporin-like primer combinations and their most similar nown aquaporin sequences.

Oznaka sekvence oz. fragmenta	Kombinacija /Primer	Skupina MIP	Dolžina (bp, A. K.)	NCBI BLAST: tblastx
1-2	2/PIPF1 + PIPR1 (START+T M6)	PIP	202; 67	Aquaporin PIP2-like <i>Glycine max</i> (acc. XM003518249.1); <i>Phaseolus vulgaris</i> aquaporin EF 624002
1-3	2/PIPF1 + PIPR1 (START+T M6)	PIP	206; 68	Aquaporin PIP2-like <i>Glycine max</i> (acc. XM003518249.1)
13-5	18/PIPF2 + PIPR1 (N terminal + TM6)	PIP	993; 331 Frame +3	<i>Phaseolus vulgaris</i> putative aquaporin-1 (Mip-1) mRNA, (acc. U97023.1)
13-9	18/PIPF2 + PIPR1 (N terminal + TM6)	PIP	984; 328 Frame +3	aquaporin 2 <i>Bruguiera gymnorhiza</i> (acc. ABL76066.1)
20-1	21/ TIPF2 + TIPR3 (TM2 + TM6)	TIP	642; 214 Frame -2	AF275315.1 <i>Lotus japonicus</i> water-selective transport intrinsic membrane protein 1 mRNA, complete cds 209 1131 91% 1e-891 FJ234419.1 <i>Sinapis arvensis</i> tonoplast intrinsic protein (TIP1) mRNA, complete cds 204 883 84% 6e-891 U92651.2 <i>Brassica oleracea</i> var. botrytis tonoplast intrinsic protein bobTIP26-
20-2	21/ TIPF2 + TIPR3 (TM2 + TM6)	TIP	642; 214 Frame -2	Enako kot 20-1
20-3	21/ TIPF2 + TIPR3 (TM2 + TM6)	TIP	642; 214 Frame -2	Enako kot 20-1
20-4	21/ TIPF2 + TIPR3 (TM2 + TM6)	TIP	642; 214 Frame -2	Enako kot 20-1
20-5	21/ TIPF2 + TIPR3 (TM2 + TM6)	TIP	642; 214 Frame -2	Enako kot 20-1
21-1	21/ TIPF2 + TIPR3 (TM2 + TM6)	TIP	509; 169 Frame -1	<i>Glycine max</i> aquaporin TIP4-1-like (XM_003522660.1)

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge J.

Oznaka sekvence oz. fragmenta	Kombinacija /Primer	Skupina MIP	Dolžina (bp, A. K.)	NCBI BLAST: tblastx
21-2	21/ TIPF2 + TIPR3 (TM2 + TM6)	TIP	509; 169 Frame	<i>Glycine max</i> aquaporin TIP4-1-like (Acc. 001255640.1)
21-3	21/ TIPF2 + TIPR3 (TM2 + TM6)	TIP	513; 171 Frame +1	<i>Glycine max</i> aquaporin TIP4-1-like (XM_003522660.1)
23-1	22/ TIPF3 + TIPR1 (TM2 + L5)	TIP	642; 214 Frame -2	
23-2	22/ TIPF3 + TIPR1 (TM2 + L5)	TIP	642; 214 Frame -2	AF275315.1 <i>Lotus japonicus</i> water-selective transport intrinsic membrane protein 1 mRNA, complete cds 212 1117 90% 1e-901 AP004479.1 <i>Lotus japonicus</i> genomic DNA, chromosome 1, clone: LjT03H13, TM0012b, complete sequence 212 1123 90% 4e-891 FJ234419.1 <i>Sinapis arvensis</i> tonoplast intrinsic protein (TIP1) mRNA, complete cds 204 894 86% 5e-891 U92651.2 <i>Brassica oleracea</i> var. botrytis tonoplast intrinsic protein bobTIP26-1 mRNA, complete cds 204 871 86% 8e-891 DQ226889.1 <i>Boechera divaricarpa</i> isolate SLW-D-E07 mRNA sequence 204 900 86% 8e-891 AY059134.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> putative aquaporin (At2g36830) mRNA, comple
23-3	22/ TIPF3 + TIPR1 (TM2 + L5)	TIP	642; 214 Frame -2	
23-4	22/ TIPF3 + TIPR1 (TM2 + L5)	TIP	642; 214 Frame -2	
23-5	22/ TIPF3 + TIPR1 (TM2 + L5)	TIP	642; 214 Frame -2	
19-3				<i>Glycine max</i> aquaporin TIP4-1-like NM_001255640.1 88%, 3e-76

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge J.

Oznaka sekvence oz. fragmenta	Kombinacija /Primer	Skupina MIP	Dolžina (bp, A. K.)	NCBI BLAST: tblastx
18-1, 18-2, 18-3, 18-5, 18-6, 18-7			625	AF275315.1 <i>Lotus japonicus</i> water-selective transport intrinsic membrane protein 1 mRNA, complete cds 201 1139 90% 2e-872 AJ243309.1 <i>Pisum sativum</i> mRNA for putative tonoplast intrinsic protein (gene tip1-1) 190 1158 89% 3e-862 FJ234419.1 <i>Sinapis arvensis</i> tonoplast intrinsic protein (TIP1) mRNA, complete cds 194 901 86% 3e-86
18-4				gb HQ632856.1 <i>Phaseolus vulgaris</i> Rpp4 Asian soybean rust resistance gene locus 86% 3e-27
17-3				Accession Description Max score Total score Query coverage E value N Links NM_001255640.1 <i>Glycine max</i> aquaporin TIP4-1-like (LOC100793258), mRNA >gb BT093886.1 Soybean clone JCVI-FLGm-14G14 unknown mRNA 141 1881 75% 2e-1041 XM_003522660.1 PREDICTED: <i>Glycine max</i> aquaporin TIP4-1-like (LOC100811447), mRNA 138 1954 76% 7e-104
17-2				NM_001255640.1 <i>Glycine max</i> aquaporin TIP4-1-like (LOC100793258), mRNA >gb BT093886.1 Soybean clone JCVI-FLGm-14G14 unknown mRNA 219 1936 77% 5e-1101 XM_003522660.1 PREDICTED: <i>Glycine max</i> aquaporin TIP4-1-like (LOC100811447), mRNA 217 1948 77% 1e-1091
17-1				NM_001255640.1 <i>Glycine max</i> aquaporin TIP4-1-like (LOC100793258), mRNA >gb BT093886.1 Soybean clone JCVI-FLGm-14G14 unknown mRNA 219 1926 77% 5e-1104 XM_003522660.1 PREDICTED: <i>Glycine max</i> aquaporin TIP4-1-like (LOC100811447), mRNA 217 1936 77% 1e-109

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge J.

Oznaka sekvence oz. fragmenta	Kombinacija /Primer	Skupina MIP	Dolžina (bp, A. K.)	NCBI BLAST: tblastx
3-5			985; pozor: ne najdem od plazmida sekvenca na 3' ATCAC	EF030420.1 <i>Jatropha curcas</i> aquaporin mRNA, complete cds 225 1371 75% 6e-1343 EF126757.1 <i>Bruguiera gymnorhiza</i> aquaporin 2 (PIP2) mRNA, complete cds 223 1309 76% 6e-1343 GU989036.1 <i>Dianthus caryophyllus</i> aquaporin mRNA, complete cds 222 1198 75% 2e-1333 JF706350.1 <i>Dianthus caryophyllus</i> pip2 (PIP2) gene, complete cds, alternatively spliced 224 1264 80% 6e-1334 EU599222.1 <i>Manihot esculenta</i> aquaporin (AQP) gene, complete cds
3-6			587	U97023.1 <i>Phaseolus vulgaris</i> putative aquaporin-1 (Mip-1) mRNA, complete cds 174 1643 68% 7e-77

PRILOGA K

Rezultati fizioloških parametrov RIL navadnega fižola, merjeni v treh časovnih stopnjah iz poskusov na BF in KIS.

Appendix K: Results of physiological parameters measured on 82 RILs of common bean at three time-stages of drought stress in experiments at BF and KIS.

Obravnavanje			Parameter											
			Vodni potencial (-MPa)				Potencialna fotokemična učinkovitost (Fv'/Fm')				ETR			
RI	Dan suše		$\bar{x} \pm SE$				$\bar{x} \pm SE$				$\bar{x} \pm SE$			
L	B	KI	BF		KIS		BF		KIS		BF		KIS	
F	S													
1	0	0	0,18 ± 0,07	a	0,44 ± 0,04	a	0,77 ± 0,01	a	0,72 ± 0,04	a	8,57 ± 0,55	a	17,48 ± 2,32	a
	10	14	0,47 ± 0,07	a	1,95 ± 0,2	b	0,55 ± 0,12	a	0,44 ± 0,11	a	4,39 ± 1,16	a	9,03 ± 1,05	a
	23	17	1,4 ± 0,7	b	0,95 ± 0	a b	0,61 ± 0,03	a	0,61 ± 0,04	a	4 ± 1,54	a	19,24 ± 1,09	a
2	0	0	0,23 ± 0,07	a	0,56 ± 0,07	a	0,76 ± 0,02	a	0,72 ± 0,04	a	7,97 ± 0,17	a	19,61 ± 2,41	a
	10	14	0,47 ± 0,13	a	2,55 ± 0,78	b	0,57 ± 0,09	a	0,4 ± 0,1	a	5,16 ± 2,03	a	9,58 ± 0,3	a
	23	17	1,85 ± 0,57	b	1 ± 0	a	0,61 ± 0,06	a	0,63 ± 0,03	a	1,9 ± 0,32	a	30,38 ± 5,03	a
3	0	0	0,18 ± 0,06	a	0,55 ± 0	a	0,65 ± 0,08	a	0,77 ± 0,01	a	8,47 ± 1,68	a	16,03 ± 1,4	a
	10	14	0,33 ± 0,03	a	3,3 ± 0,16	b	0,71 ± 0,07	a	0,58 ± 0,05	a	6,14 ± 2,84	a	8,34 ± 0,44	a
	23	17	1,45 ± 0,64	a	0,9 ± 0	a	0,71 ± 0,01	a	0,55 ± 0,02	a	3,81 ± 0,53	a	11,83 ± 0,99	a
4	0	0	0,12 ± 0,04	a	0,75 ± 0,14	a	0,63 ± 0,08	a	0,76 ± 0,01	a	10,57 ± 1,05	a	28,47 ± 3,31	a
	10	14	0,47 ± 0,27	a	1,3 ± 0,16	a	0,67 ± 0,1	a	0,55 ± 0,05	a	6,78 ± 2,19	a	15,78 ± 1,88	a
	23	17	1,67 ± 0,15	b	1,15 ± 0	a	0,56 ± 0,09	a	0,75 ± 0,04	a	5,16 ± 1,21	a	14,41 ± 1,23	a
5	0	0	0,2 ± 0,05	a	0,72 ± 0,14	a	0,68 ± 0,04	a	0,77 ± 0,03	a	9,23 ± 0,22	a	33,88 ± 5,23	a
	10	14	0,25 ± 0,1	a	1,28 ± 0,06	a	0,69 ± 0,08	a	0,41 ± 0,03	a	7,19 ± 2,77	a	11,44 ± 2,07	b
	23	17	1,5 ± 0,49	a	0,7 ± 0	a	0,39 ± 0,06	a	0,73 ± 0,02	a	3,93 ± 0,04	a	31,72 ± 3,65	a b
6	0	0	0,28 ± 0,07	a	0,62 ± 0,08	a	0,71 ± 0,03	a	0,76 ± 0,01	a	12,33 ± 2,35	a	23,95 ± 4,28	a
	10	14	0,32 ± 0,14	a	1,65 ± 0,04	a	0,67 ± 0,07	a	0,37 ± 0,06	b	9,38 ± 1,76	a	11,76 ± 1,79	a
	23	17	1,3 ± 0,37	a	1,05 ± 0	a	0,57 ± 0,04	a	0,6 ± 0,06	a b	5,47 ± 1,43	a	21,53 ± 1,1	a
7	0	0	0,22 ± 0,04	a	0,56 ± 0,01	a	0,66 ± 0	a	0,77 ± 0,02	a	14,17 ± 5,42	a	23,28 ± 2,83	a
	10	14	0,28 ± 0,04	a	1,9 ± 0,57	a	0,59 ± 0,08	a	0,26 ± 0,03	b	5,62 ± 1,36	a	9,23 ± 2,21	a
	23	17	1,85 ± 0,25	b	0,9 ± 0	a	0,73 ± 0,04	a	0,67 ± 0,06	a	6,28 ± 1,11	a	27,19 ± 3,06	a

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge K.

Obravnavanje			Parameter											
			Vodni potencial (-MPa)				Potencialna fotokemična učinkovitost (Fv'/Fm')				ETR			
RI	Dan suše		$\bar{x} \pm SE$				$\bar{x} \pm SE$				$\bar{x} \pm SE$			
L	B	KI	BF		KIS		BF		KIS		BF		KIS	
F	S													
8	0	0	0,2 ± 0,03	a	0,51 ± 0,01	a	0,77 ± 0,01	a	0,76 ± 0,01	a	5,43 ± 1,57	a	25,77 ± 5,56	a
	10	14	0,37 ± 0,07	a	1,35 ± 0,04	a	0,66 ± 0,05	a	0,49 ± 0,12	a	9,11 ± 1,25	a	15,88 ± 4,05	a
	23	17	1,45 ± 0,16	a	0,95 ± 0	a	0,71 ± 0,03	a	0,65 ± 0,04	a	7,56 ± 0,58	a	25,25 ± 0,82	a
9	0	0	0,12 ± 0,07	a	0,59 ± 0,05	a	0,59 ± 0,1	a	0,76 ± 0	a	13,97 ± 3,74	a	25,78 ± 3,75	a
	10	14	0,35 ± 0,1	a	3,5 ± 0	b	0,66 ± 0,03	a	0,18 ± 0,05	b	10,44 ± 2,04	a	4,37 ± 1,63	a
	23	17	1,13 ± 0,53	a	0,75 ± 0	a	0,57 ± 0,07	a			5,3 ± 0,14	a		
10	0	0	0,13 ± 0,04	a	0,5 ± 0,11	a	0,57 ± 0,12	a	0,77 ± 0,01	a	11,3 ± 2,79	a	24,32 ± 3,51	a
	10	14	0,23 ± 0,06	a	2 ± 0,41	b	0,57 ± 0,04	a	0,41 ± 0,03	b	9,96 ± 1,53	a	13,18 ± 1,55	a
	23	17	2,95 ± 0,27	b	0,9 ± 0	a b			0,63 ± 0,02	a b			16,69 ± 0,59	a
12	0	0	0,1 ± 0,03	a	0 ± 0	a	0,65 ± 0,07	a	0 ± 0	a	6,27 ± 0,92	a	0 ± 0	a
	10	14	0,22 ± 0,04	a	0 ± 0	a	0,58 ± 0,02	a	0 ± 0	a	11,13 ± 0,35	a	0 ± 0	a
	23	17	2,55 ± 0,63	b	0 ± 0	a			0 ± 0	a			0 ± 0	a
13	0	0	0,12 ± 0,02	a	0,76 ± 0,14	a	0,72 ± 0,01	a	0,77 ± 0,01	a	8,78 ± 1,44	a	16,24 ± 3,75	a
	10	14	0,27 ± 0,04	a	2,6 ± 0,73	b	0,64 ± 0,06	a	0,36 ± 0,09	b	8,87 ± 2,42	a	9,86 ± 2,37	a
	23	17	2,8 ± 0,47	b	1,15 ± 0	a b			0,72 ± 0,03	a b			14,69 ± 0,38	a
14	0	0	0,13 ± 0,06	a	0,54 ± 0,02	a	0,65 ± 0,04	a	0,78 ± 0	a	8,13 ± 0,85	a	16,96 ± 2,51	a
	10	14	0,27 ± 0,06	a	1,98 ± 0,14	a	0,65 ± 0,09	a	0,47 ± 0,04	a	7,58 ± 3,15	a	10,47 ± 0,53	a
	23	17	1,65 ± 0,86	b	0,8 ± 0	a			0,71 ± 0,01	a			14,05 ± 1,77	a
15	0	0	0,13 ± 0,02	a	0,54 ± 0,1	a	0,68 ± 0,04	a	0,77 ± 0,01	a	9,07 ± 1,7	a	20,18 ± 1,07	a
	10	14	0,17 ± 0,07	a	2,85 ± 0,53	b	0,67 ± 0,03	a	0,55 ± 0,05	a b	9,96 ± 3,14	a	8,24 ± 1,84	a
	23	17	3 ± 0,32	b	3,5 ± 0	b			0,28 ± 0,02	b			7,87 ± 0,67	a
16	0	0	0,15 ± 0,05	a	0 ± 0	a	0,59 ± 0,01	a	0 ± 0	a	7,83 ± 0,47	a	0 ± 0	a
	10	14	0,17 ± 0,03	a	0 ± 0	a	0,7 ± 0,09	a	0 ± 0	a	10,13 ± 2,75	a	0 ± 0	a
	23	17	1,47 ± 0,07	a	0 ± 0	a	0,64 ± 0,03	a	0 ± 0	a	5,74 ± 0,14	a	0 ± 0	a

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge K.

Obravnavanje			Parameter											
			Vodni potencial (-MPa)				Potencialna fotokemična učinkovitost (Fv'/Fm')				ETR			
RI	Dan suše		$\bar{x} \pm SE$				$\bar{x} \pm SE$				$\bar{x} \pm SE$			
L	B	KI	BF		KIS		BF		KIS		BF		KIS	
	F	S												
17	0	0	0,08 ± 0,02	a	0,62 ± 0,04	a	0,72 ± 0,01	a	0,77 ± 0,01	a	11,47 ± 1,53	a	22,38 ± 2,84	a
	10	14	0,3 ± 0,1	a	2,65 ± 0,69	b	0,63 ± 0,08	a	0,36 ± 0,13	b	8,67 ± 0,61	a	11,28 ± 2,14	a
	23	17	1,38 ± 0,06	a	0,75 ± 0	a	0,59 ± 0,05	a	0,7 ± 0,07	a	6,26 ± 0,84	a	15,18 ± 2,1	a
18	0	0	0,22 ± 0,07	a	0,5 ± 0,02	a	0,66 ± 0,06	a	0,75 ± 0,01	a	8,4 ± 0,32	a	19,63 ± 0,94	a
	10	14	0,2 ± 0,03	a	2,55 ± 0,78	b	0,63 ± 0,12	a	0,51 ± 0,05	a	6,34 ± 1,09	a	8,22 ± 0,22	a
	23	17	1,78 ± 0,19	b	1,6 ± 0	a	0,66 ± 0,02	a	0,69 ± 0,04	a	6,63 ± 0,23	a	15,57 ± 1,24	a
19	0	0	0,33 ± 0,03	a	0,63 ± 0,08	a	0,67 ± 0,03	a	0,76 ± 0,01	a	7,8 ± 2,67	a	24,28 ± 7,07	a
	10	14	0,58 ± 0,22	a	2,65 ± 0,2	b	0,61 ± 0,07	a	0,32 ± 0,03	b	5,91 ± 0,75	a	18,85 ± 7,12	a
	23	17	1,87 ± 0,74	b	1,4 ± 0	a	0,62 ± 0,02	a	0,38 ± 0,06	b	4,82 ± 0,44	a	16,76 ± 0,75	a
20	0	0	0,22 ± 0,12	a	0,56 ± 0,09	a	0,72 ± 0,01	a	0,79 ± 0,01	a	11,47 ± 1,53	a	28,06 ± 2,95	a
	10	14	0,27 ± 0,09	a	1,45 ± 0,29	a	0,6 ± 0,04	a	0,3 ± 0,08	b	7,28 ± 1,39	a	9,19 ± 0,91	a
	23	17	1,53 ± 0,07	a	0,95 ± 0	a	0,7 ± 0,02	a	0,68 ± 0,03	a	5,78 ± 0,31	a	21,83 ± 0,99	a
21	0	0	0,1 ± 0,03	a	0,55 ± 0	a	0,66 ± 0,06	a	0,71 ± 0,02	a	8,4 ± 0,32	a	35,43 ± 7,79	a
	10	14	0,42 ± 0,17	a	1,68 ± 0,18	a	0,67 ± 0,03	a	0,28 ± 0,11	b	7,82 ± 0,73	a	8,68 ± 3,01	b
	23	17	2,17 ± 0,67	b	1,2 ± 0	a	0,71 ± 0,02	a	0,72 ± 0,04	a	5,51 ± 0,88	a	19,18 ± 0,49	a
22	0	0	0,2 ± 0,05	a	0,82 ± 0,05	a	0,67 ± 0,03	a	0,78 ± 0,01	a	7,8 ± 2,67	a	21,59 ± 1,66	a
	10	14	0,62 ± 0,3	a	3 ± 0,41	b	0,71 ± 0,03	a	0,34 ± 0,01	b	7,36 ± 0,77	a	21,25 ± 11,87	a
	23	17	1,33 ± 0,48	a	3,5 ± 0	b	0,67 ± 0,03	a	0,35 ± 0,08	b	4,54 ± 0,78	a	18,9 ± 3,95	a
24	0	0	0,15 ± 0,08	a	0,57 ± 0,01	a	0,71 ± 0,02	a	0,75 ± 0,03	a	8,07 ± 2,42	a	37,18 ± 5,81	a
	10	14	0,28 ± 0,11	a	3,5 ± 0	b	0,73 ± 0,05	a	0,42 ± 0,08	a	4,02 ± 2,82	a	13,18 ± 0,75	b
	23	17	2,5 ± 0,36	b	0,9 ± 0	a	0,72 ± 0,02	a	0,65 ± 0,03	a	4,17 ± 0,74	a	19,98 ± 0,54	a
25	0	0	0,17 ± 0,07	a	0,61 ± 0,02	a	0,66 ± 0,03	a	0,7 ± 0,04	a	11,23 ± 3,1	a	43,85 ± 8,69	a
	10	14	0,47 ± 0,22	a	2,63 ± 0,71	b	0,64 ± 0,14	a	0,43 ± 0,08	a	3,39 ± 1,99	a	14,27 ± 1,84	b
	23	17	1,97 ± 0,22	b	1,45 ± 0	a	0,72 ± 0,02	a	0,73 ± 0,06	a	4,03 ± 0,51	a	26,17 ± 2,28	a

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge K.

Obravnavanje			Parameter											
			Vodni potencial (-MPa)						Potencialna fotokemična učinkovitost (Fv'/Fm')					
RI	Dan suše		$\bar{x} \pm SE$						$\bar{x} \pm SE$					
L	B	KI	BF			KIS			BF			KIS		
F	S													
26	0	0	0,25 ± 0,05	a	0,67 ± 0,07	a	0,7 ± 0,04	a	0,78 ± 0,01	a	12,87 ± 3,51	a	18,08 ± 0,42	a
	10	14	0,23 ± 0,04	a	2,6 ± 0,73	b	0,63 ± 0,12	a	0,44 ± 0,03	a	3,94 ± 2,18	a	9,6 ± 0,51	a
	23	17	1,6 ± 0,19	a	2,5 ± 0	b	0,7 ± 0,01	a	0,31 ± 0,02	b	5,49 ± 0,28	a	16,59 ± 3,31	a
27	0	0	0,2 ± 0,09	a	0,66 ± 0,12	a	0,7 ± 0,04	a	0,77 ± 0,02	a	8,8 ± 3,35	a	20,41 ± 2,23	a
	10	14	0,23 ± 0,03	a	2,15 ± 0,45	b	0,68 ± 0,07	a	0,35 ± 0,05	b	5,11 ± 2,38	a	10,6 ± 0,86	a
	23	17	0,63 ± 0,96	a	1,5 ± 0	b	0,71 ± 0,02	a	0,64 ± 0,08	b	5,88 ± 2,14	a	25,33 ± 4,22	a
28	0	0	0,15 ± 0,06	a	0,59 ± 0,02	a	0,76 ± 0,01	a	0,74 ± 0,05	a	7,73 ± 1,69	a	25,1 ± 3	a
	10	14	0,35 ± 0,18	a	1,85 ± 0,37	a	0,7 ± 0,05	a	0,29 ± 0,06	b	4,09 ± 2,66	a	9,9 ± 2,22	a
	23	17	0,88 ± 0,36	a	1 ± 0	a	0,7 ± 0,03	a	0,68 ± 0	a	5,89 ± 0,27	a	28,53 ± 1,34	a
29	0	0	0,15 ± 0,03	a	0 ± 0	a	0,66 ± 0,03	a	0 ± 0	a	12,63 ± 4,69	a	0 ± 0	a
	10	14	0,1 ± 0,68	a	0 ± 0	a	0,74 ± 0,07	a	0 ± 0	a	4,17 ± 3,62	a	0 ± 0	a
	23	17	2,6 ± 0,31	b	0 ± 0	a	0,73 ± 0,03	a	0 ± 0	a	5,19 ± 0,46	a	0 ± 0	a
30	0	0	0,2 ± 0,08	a	0 ± 0	a	0,67 ± 0,01	a	0,81 ± 0,01	a	9,33 ± 0,09	a	14,69 ± 0,43	a
	10	14	0,25 ± 0,05	a	0 ± 0	a	0,72 ± 0,09	a	0,74 ± 0,02	a	4,11 ± 2,91	a	12,71 ± 1,01	a
	23	17	1,77 ± 0,52	b	0 ± 0	a	0,6 ± 0,06	a	0,57 ± 0,14	a	5,11 ± 0,85	a	22,78 ± 6,09	a
31	0	0	0,18 ± 0,06	a	0,54 ± 0,01	a	0,72 ± 0,01	a	0,76 ± 0,01	b	10,07 ± 1,47	a	17,79 ± 2,31	a
	10	14	0,32 ± 0,1	b	3,5 ± 0	b	0,7 ± 0,09	a	0,38 ± 0,06	a	4,74 ± 3,71	a	12,44 ± 1,83	a
	23	17	1,73 ± 0,67	b	1,2 ± 0	a	0,69 ± 0,04	a	0,79 ± 0,02	b	5,44 ± 0,51	a	22,98 ± 1,42	a
32	0	0	0,2 ± 0,06	a	0,74 ± 0,12	a	0,7 ± 0,04	a	0,75 ± 0,01	a	13,63 ± 3,17	a	22,49 ± 2,55	a
	10	14	0,35 ± 0,1	a	1,93 ± 0,14	a	0,7 ± 0,07	a	0,34 ± 0,03	b	3,98 ± 3,41	a	9,71 ± 0,85	a
	23	17	2,03 ± 0,62	b	1,15 ± 0	a	0,72 ± 0,03	a	0,75 ± 0,02	b	6,18 ± 0,82	a	19,18 ± 1,3	a
33	0	0	0,18 ± 0,02	a	0,69 ± 0,04	a	0,69 ± 0,03	a	0,76 ± 0,03	a	9,67 ± 2,09	a	26,12 ± 2,31	a
	10	14	0,25 ± 0,03	a	1,3 ± 0,08	a	0,68 ± 0,12	a	0,43 ± 0,05	a	4,97 ± 3,85	a	13,61 ± 0,84	a
	23	17	3 ± 0,3	b	0,75 ± 0	a	0,71 ± 0,02	a	0,53 ± 0,04	a	5,88 ± 0,52	a	30,81 ± 7,22	a

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge K.

Obravnavanje			Parameter											
			Vodni potencial (-MPa)				Potencialna fotokemična učinkovitost (Fv'/Fm')				ETR			
RI	Dan suše		$\bar{x} \pm SE$				$\bar{x} \pm SE$				$\bar{x} \pm SE$			
L	B	KI	BF		KIS		BF		KIS		BF		KIS	
F	S													
34	0	0	0,13 ± 0,02	a	0,78 ± 0,07	a b	0,69 ± 0,03	a	0,76 ± 0,01	a	10,13 ± 0,64	a	19,11 ± 6,48	a
	10	14	0,23 ± 0,06	a	3,05 ± 0,37	a	0,69 ± 0,13	a	0,54 ± 0,14	a	6,79 ± 5,76	a	15,89 ± 4,44	a
	23	17	1,6 ± 0,1	a	1,33 ± 0	b	0,72 ± 0,02	a	0,6 ± 0,02	a	5,79 ± 0,86	a	19,05 ± 0,5	a
35	0	0	0,1 ± 0,03	a	0,93 ± 0,22	a	0,71 ± 0,03	a	0,77 ± 0,01	a	14,2 ± 2,56	a	24,26 ± 2,6	a
	10	14	0,38 ± 0,09	a	1,88 ± 0,02	a	0,7 ± 0,09	a	0,36 ± 0,1	b	6,79 ± 5,74	a	10,8 ± 2,79	a
	23	17	1,38 ± 0,71	b	1,5 ± 0	a	0,63 ± 0,07	a	0,76 ± 0,02	a	5,49 ± 0,66	a	24,03 ± 2,62	a
36	0	0	0,18 ± 0,08	a	0,73 ± 0,09	a	0,73 ± 0,02	a	0,79 ± 0,01	a	21,1 ± 4,11	a	21,24 ± 3,87	a
	10	14	0,22 ± 0,09	a	2,6 ± 0,73	b	0,68 ± 0,11	a	0,36 ± 0,13	b	7,09 ± 6,31	a	10,03 ± 3,47	a
	23	17	1,7 ± 0,81	b	1,25 ± 0	a b	0,7 ± 0	a	0,73 ± 0,02	a b	6,16 ± 0,61	a	25,26 ± 0,57	a
37	0	0	0,2 ± 0,06	a	0,66 ± 0,02	a	0,66 ± 0,05	a	0,78 ± 0,01	a	12,97 ± 1,69	a	15,49 ± 3,38	a
	10	14	0,5 ± 0,16	a	2,35 ± 0,2	b	0,57 ± 0,17	a	0,39 ± 0,04	b	4,44 ± 3,51	a	12,11 ± 0,79	a
	23	17	2,25 ± 0,88	b	0,95 ± 0	a b	0,61 ± 0,02	a	0,72 ± 0,05	a b	6,89 ± 1,5	a	23,12 ± 0,79	a
38	0	0	0,17 ± 0,03	a	0,63 ± 0,01	a	0,73 ± 0,03	a	0,81 ± 0,02	a	13,13 ± 3,18	a	12,91 ± 0,82	a
	10	14	0,38 ± 0,21	a	2,6 ± 0,73	b	0,68 ± 0,11	a	0,67 ± 0,07	a	7,07 ± 6,27	a	8,46 ± 2,16	a
	23	17	2,28 ± 0,29	b	1,25 ± 0	a b	0,6 ± 0,03	a	0,5 ± 0,04	a	6,99 ± 1,18	a	16,75 ± 1,49	a
39	0	0	0,22 ± 0,06	a	0,59 ± 0,02	a	0,71 ± 0,05	a	0,78 ± 0,02	a	14,4 ± 2,3	a	18,92 ± 3,79	a
	10	14	0,25 ± 0,03	a	3,5 ± 0	b	0,66 ± 0,15	a	0,57 ± 0,02	b	5,86 ± 4,82	a	16,58 ± 0,51	a
	23	17	2 ± 0,76	b	0,7 ± 0	a	0,73 ± 0,01	a	0,77 ± 0,03	a b	9,84 ± 2,81	a	27,85 ± 5,8	a
40	0	0	0,18 ± 0,02	a	0,27 ± 0,11	a	0,64 ± 0,07	a	0,7 ± 0,06	a	13,67 ± 5,72	a	18,38 ± 1,43	a
	10	14	0,32 ± 0,1	a	1,58 ± 0,06	a	0,64 ± 0,16	a	0,54 ± 0,1	a	5,73 ± 4,6	a	15,64 ± 1,72	a
	23	17	2,48 ± 0,42	b	1,3 ± 0	a	0,71 ± 0,01	a	0,78 ± 0,01	a	8,93 ± 2,22	a	27,7 ± 1,14	a
41	0	0	0,13 ± 0,02	a	0,5 ± 0,02	a	0,73 ± 0,02	a	0,78 ± 0,01	a	20,17 ± 3,98	a	13,17 ± 1,14	a
	10	14	0,32 ± 0,04	a	3,25 ± 0,2	b	0,69 ± 0,12	a	0,62 ± 0,03	a	5,03 ± 4,3	a	7,72 ± 0,57	a
	23	17	2,65 ± 0,26	b	0,9 ± 0	a	0,67 ± 0,02	a	0,54 ± 0,04	a	3,93 ± 0,84	a	13,16 ± 2,12	a

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge K.

Obravnavanje			Parameter											
			Vodni potencial (-MPa)				Potencialna fotokemična učinkovitost (Fv'/Fm')				ETR			
RI	Dan suše		$\bar{x} \pm SE$				$\bar{x} \pm SE$				$\bar{x} \pm SE$			
L	B	KI	BF		KIS		BF		KIS		BF		KIS	
F	S													
42	0	0	0,1 ± 0	a	0,59 ± 0,1	a	0,73 ± 0,01	a	0,81 ± 0,01	a	16,5 ± 2,58	a	24,05 ± 4,27	a
	10	14	0,3 ± 0,1	a	1,7 ± 0,16	a	0,58 ± 0,19	a	0,47 ± 0,14	a	3,31 ± 2,38	a	14,65 ± 4,89	a
	23	17	2,68 ± 0,57	b	1 ± 0	a	0,71 ± 0,05	a	0,74 ± 0,04	a	4,06 ± 0,6	a	21,22 ± 1,58	a
43	0	0	0 ± 0	a	0,59 ± 0,02	a	0 ± 0	a	0,79 ± 0,01	a	0 ± 0	a	22 ± 4,4	a
	10	14	0 ± 0	a	2,28 ± 0,1	b	0 ± 0	a			0 ± 0	a		
	23	17	0 ± 0	a	1,33 ± 0	a b	0 ± 0	a			0 ± 0	a		
44	0	0	0,18 ± 0,08	a	0,6 ± 0,07	a	0,72 ± 0,04	a	0,76 ± 0,03	a	8,87 ± 2,17	a	22,11 ± 6,27	a
	10	14	0,42 ± 0,15	a	1,95 ± 0,2	a	0,65 ± 0,13	a	0,44 ± 0,03	a	3,77 ± 2,77	a	16,19 ± 2,03	a
	23	17	2,67 ± 0,28	b	1,45 ± 0	a	0,65 ± 0,05	a	0,64 ± 0,08	a	7,63 ± 1,47	a	17,79 ± 3,17	a
45	0	0	0,12 ± 0,02	a	0,56 ± 0,04	a	0,69 ± 0,06	a	0,76 ± 0	a	8,97 ± 1,28	a	24,87 ± 4,24	a
	10	14	0,42 ± 0,17	a	2 ± 0,49	a	0,71 ± 0,08	a	0,45 ± 0,02	a	8,98 ± 7,81	a	10,89 ± 0,77	a
	23	17	1,35 ± 0,72	b	1,5 ± 0	a	0,53 ± 0,12	a	0,54 ± 0,11	a	6,58 ± 0,23	a	13,18 ± 1,78	a
46	0	0	0,08 ± 0,02	a	0,68 ± 0,02	a	0,7 ± 0,01	a	0,75 ± 0,03	a	9,27 ± 0,92	a	21,56 ± 2,9	a
	10	14	0,4 ± 0,06	a	2,28 ± 0,1	b	0,69 ± 0,12	a			10,8 ± 9,62	a		
	23	17	0,52 ± 0,09	a	1,33 ± 0	a b	0,73 ± 0,01	a			7,27 ± 0,75	a		
47	0	0	0,2 ± 0,03	a	0,75 ± 0,12	a	0,73 ± 0,03	a	0,76 ± 0,02	a	12,23 ± 1,11	a	26,79 ± 3,83	a
	10	14	0,23 ± 0,06	a	2,35 ± 0,45	b	0,61 ± 0,21	a	0,47 ± 0,05	a	3,5 ± 2,58	a	9,2 ± 0,57	a
	23	17	1,85 ± 0,23	b	1,35 ± 0	a b	0,63 ± 0,05	a	0,8 ± 0	a	6,56 ± 0,19	a	26,9 ± 2,94	a
48	0	0	0,17 ± 0,06	a	0,71 ± 0,05	a	0,61 ± 0,06	a	0,79 ± 0,02	a	13,43 ± 2,03	a	14,74 ± 1,43	a
	10	14	0,28 ± 0,1	a	2,55 ± 0,78	b	0,61 ± 0,19	a	0,62 ± 0	a	4,83 ± 3,77	a	8,62 ± 0,61	a
	23	17	1,53 ± 0,44	a	1,7 ± 0	a b	0,58 ± 0,04	a	0,55 ± 0,02	a	6,39 ± 0,53	a	24,59 ± 2	a
50	0	0	0,25 ± 0,05	a	0,76 ± 0,07	a	0 ± 0	a	0,73 ± 0,01	a	0 ± 0	a	32,43 ± 2,14	a
	10	14	0,43 ± 0,07	a	1,58 ± 0,18	a	0 ± 0	a	0,55 ± 0,05	a	0 ± 0	a	10,78 ± 0,54	a
	23	17	2,5 ± 0,85	b	1 ± 0	a	0 ± 0	a	0,58 ± 0,1	a	0 ± 0	a	18,99 ± 4,93	a

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge K.

Obravnavanje			Parameter											
			Vodni potencial (-MPa)				Potencialna fotokemična učinkovitost (Fv'/Fm')				ETR			
RI	Dan suše		$\bar{x} \pm SE$				$\bar{x} \pm SE$				$\bar{x} \pm SE$			
L	B	KI	BF		KIS		BF		KIS		BF		KIS	
F	S													
53	0	0	0,18 ± 0,02	a	0,68 ± 0,09	a	0,76 ± 0	a	0,73 ± 0,03	a	14,83 ± 2,52	a	20,22 ± 1,78	a
	10	14	0,47 ± 0,07	a	2,85 ± 0,53	b	0,65 ± 0,14	a	0,49 ± 0,04	a	5,39 ± 4,44	a	12,24 ± 0,66	a
	23	17	2,53 ± 0,61	b	1,35 ± 0	a	0,51 ± 0,09	a	0,59 ± 0,07	a	7,11 ± 2,2	a	25,61 ± 0,27	a
54	0	0	0,13 ± 0,02	a	0,7 ± 0,07	a	0,75 ± 0,01	a	0,68 ± 0,09	a	10,87 ± 1,08	a	18,71 ± 3,75	a
	10	14	0,47 ± 0,13	a	1,45 ± 0,12	a	0,61 ± 0,18	a	0,52 ± 0,13	a	3,32 ± 2,04	a	15,31 ± 4,29	a
	23	17	1,72 ± 0,62	b	1,45 ± 0	a	0,63 ± 0,06	a	0,69 ± 0,02	a	6,14 ± 1,11	a	33,59 ± 4,68	a
55	0	0	0,17 ± 0,07	a	0,73 ± 0	a	0,74 ± 0,02	a	0,8 ± 0,03	a	11,43 ± 2,48	a	20,55 ± 3,11	a
	10	14	0,7 ± 0,4	a	2,7 ± 0,65	b	0,64 ± 0,12	a	0,31 ± 0,1	b	6,36 ± 5,16	a	6,99 ± 1,48	a
	23	17	1,55 ± 0,65	b	0,7 ± 0	a	0,65 ± 0,03	a	0,73 ± 0,03	a	8,37 ± 2,1	a	37,53 ± 4,55	b
56	0	0	0,13 ± 0,03	a	0,64 ± 0,01	a	0,69 ± 0,06	a	0,74 ± 0,01	a	22,17 ± 3,2	a	26,52 ± 0,66	a
	10	14	0,85 ± 0,41	a	2,6 ± 0,73	b	0,66 ± 0,16	a	0,63 ± 0,03	a	5,6 ± 6,71	a	10,82 ± 1,52	a
	23	17	1,73 ± 0,36	b	1,35 ± 0	a	0,62 ± 0,06	a	0,5 ± 0,03	a	5,77 ± 0,76	a	13,82 ± 0,84	a
57	0	0	0,17 ± 0,02	a	0,67 ± 0,03	a	0,7 ± 0,03	a	0,78 ± 0,03	a	21,37 ± 0,88	a	23,26 ± 3,29	a
	10	14	0,5 ± 0,18	a	2,43 ± 0,88	b	0,67 ± 0,14	a	0,44 ± 0,16	b	10,47 ± 9,25	a	14,14 ± 4,42	a
	23	17	1,63 ± 0,64	b	1,25 ± 0	a	0,67 ± 0,02	a	0,66 ± 0,05	a	6,93 ± 1,31	a	26,08 ± 0,14	a
58	0	0	0,1 ± 0	a	0,67 ± 0,06	a	0,69 ± 0,03	a	0,74 ± 0,04	a	22,5 ± 2,67	a	23,97 ± 3,3	a
	10	14	0,25 ± 0,1	a	2,1 ± 0,41	a	0,71 ± 0,06	a	0,55 ± 0,15	a	9,12 ± 7,72	a	18,47 ± 4,48	a
	23	17	0,57 ± 0,23	a	1,25 ± 0	a	0,74 ± 0,01	a	0,74 ± 0,01	a	6,69 ± 1,09	a	22,93 ± 0,89	a
59	0	0	0,13 ± 0,03	a	0,53 ± 0,03	a	0,75 ± 0,01	a	0,77 ± 0,03	a	14,23 ± 1,89	a	28,1 ± 3,02	a
	10	14	0,55 ± 0,23	a	1,25 ± 0,04	a	0,71 ± 0,13	a	0,45 ± 0,1	a	3,92 ± 3,71	a	9,93 ± 1,29	a
	23	17	1,23 ± 0,88	b	0,9 ± 0	a	0,55 ± 0,04	a	0,72 ± 0,01	a	5,12 ± 1,26	a	24,66 ± 0,78	a
61	0	0	0,1 ± 0,03	a	0,68 ± 0,01	a	0,71 ± 0,01	a	0,7 ± 0,03	a	12,3 ± 1,84	a	29,74 ± 5,04	a
	10	14	0,33 ± 0,06	a	2,28 ± 0,1	b	0,69 ± 0,06	a	0,82 ± 0	a	6,33 ± 7,61	a	6,96 ± 0,41	b
	23	17	0,95 ± 0,33	a	1,33 ± 0	a	0,59 ± 0,05	a	0,6 ± 0,1	a	6,49 ± 0,71	a	17,88 ± 2,31	a

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge K.

Obravnavanje			Parameter											
			Vodni potencial (-MPa)				Potencialna fotokemična učinkovitost (Fv'/Fm')				ETR			
RI	Dan suše		$\bar{x} \pm SE$				$\bar{x} \pm SE$				$\bar{x} \pm SE$			
L	B	KI	BF		KIS		BF		KIS		BF		KIS	
F	S													
62	0	0	0,1 ± 0,03	a	0,79 ± 0,04	a	0,75 ± 0,01	a	0,75 ± 0,02	a	17 ± 2,06	a	30,75 ± 3,12	a
	10	14	0,82 ± 0,44	a b	3,1 ± 0,33	b	0,71 ± 0,12	a	0,58 ± 0,09	a	8,86 ± 7,27	a	9,31 ± 0,97	a
	23	17	2,1 ± 0,16	b	1,2 ± 0	a	0,67 ± 0,05	a	0,56 ± 0,07	a	9,3 ± 1,9	a	19,72 ± 3,09	a
63	0	0	0,12 ± 0,04	a	0,65 ± 0	a	0,71 ± 0,03	a	0,8 ± 0,02	a	20,17 ± 4,27	a	24,15 ± 3,16	a
	10	14	1,12 ± 0,43	a b	1,6 ± 0	a	0,69 ± 0,06	a	0,4 ± 0,09	a	3,32 ± 4	a	13,07 ± 1,2	a
	23	17	1,23 ± 0,82	b	0,85 ± 0	a	0,56 ± 0,09	a	0,74 ± 0,02	a	6,1 ± 1,66	a	23,1 ± 4,14	a
64	0	0	0 ± 0	a	0,69 ± 0,02	a	0 ± 0	a	0,76 ± 0,01	a	0 ± 0	a	27,53 ± 2,17	a
	10	14	0 ± 0	a	1,9 ± 0	a	0 ± 0	a	0,59 ± 0,09	a	0 ± 0	a	6,18 ± 1,24	a
	23	17	0 ± 0	a	0,95 ± 0	a	0 ± 0	a	0,47 ± 0,09	a	0 ± 0	a	14,46 ± 2,88	a
65	0	0	0,18 ± 0,02	a	0,74 ± 0,01	a	0,71 ± 0,03	a	0,74 ± 0,02	a	14,27 ± 1,39	a	24,25 ± 6,26	a
	10	14	0,42 ± 0,27	a	2,75 ± 0,61	b	0,74 ± 0,06	a	0,57 ± 0,05	a	4,5 ± 3,26	a	8,25 ± 0,97	a
	23	17	2,52 ± 0,5	b	0,9 ± 0	a	0,66 ± 0,04	a	0,53 ± 0,05	a	8,83 ± 1,57	a	19,42 ± 2,25	a
66	0	0	0,22 ± 0,04	a	0,89 ± 0,25	a	0,75 ± 0,02	a	0,75 ± 0,01	a	19,4 ± 4,09	a	18,2 ± 4,2	a
	10	14	0,45 ± 0,18	a	2,05 ± 0,04	a	0,69 ± 0,09	a	0,46 ± 0,07	a	3,94 ± 3,21	a	11,43 ± 1,39	a
	23	17	2,38 ± 0,42	b	0,95 ± 0	a	0,3 ± 0,13	b	0,61 ± 0,03	a	3,49 ± 1,79	a	17,39 ± 0,66	a
67	0	0	0,2 ± 0,08	a	0,85 ± 0,16	a	0,75 ± 0,01	a	0,74 ± 0,04	a	21,1 ± 5,58	a	19,1 ± 4,44	a
	10	14	0,7 ± 0,33	a	1,8 ± 0,9	a	0,68 ± 0,11	a	0,58 ± 0,08	a	3,6 ± 2,92	a	12,96 ± 0,93	a
	23	17	2,15 ± 0,64	b	0,8 ± 0	a	0,45 ± 0,11	a	0,54 ± 0,03	a	6,21 ± 0,72	a	13 ± 0,22	a
68	0	0	0,15 ± 0,03	a	0 ± 0	a	0,7 ± 0,04	a	0,76 ± 0,01	a	13,23 ± 1,22	a	41,09 ± 17,48	a
	10	14	0,3 ± 0,09	a	0 ± 0	a	0,73 ± 0,1	a	0,8 ± 0,03	a	3,98 ± 2,46	a	5,09 ± 0,14	b
	23	17	2,13 ± 0,82	b	0 ± 0	a	0,53 ± 0,06	a	0,33 ± 0,02	b	7,91 ± 1,99	a	33,66 ± 12,95	a
69	0	0	0,17 ± 0,07	a	0,69 ± 0,01	a	0,69 ± 0,03	a	0,74 ± 0,03	a	25,4 ± 5,9	a	23,96 ± 4,81	a
	10	14	0,5 ± 0,08	a	1,65 ± 0,04	a	0,68 ± 0,07	a	0,44 ± 0,13	a	4,51 ± 3,66	b	10,05 ± 2,97	a
	23	17	1,98 ± 0,51	b	0,85 ± 0	a	0,69 ± 0,05	a	0,69 ± 0,03	a	7,29 ± 1,26	b	18,6 ± 1,02	a

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge K.

Obravnavanje			Parameter											
			Vodni potencial (-MPa)				Potencialna fotokemična učinkovitost (Fv'/Fm')				ETR			
RI	Dan suše		$\bar{x} \pm SE$				$\bar{x} \pm SE$				$\bar{x} \pm SE$			
L	B	KI	BF		KIS		BF		KIS		BF		KIS	
	F	S												
70	0	0	0,13 ± 0,03	a	0,76 ± 0,15	a	0,76 ± 0	a	0,75 ± 0,01	a	17,1 ± 2,78	a	26,92 ± 4,47	a
	10	14	0,28 ± 0,02	a	3,05 ± 0,37	b	0,7 ± 0,12	a	0,49 ± 0,02	a	3,34 ± 1,78	a	11,73 ± 0,15	a
	23	17	1,4 ± 0,71	b	1,35 ± 0	a	0,68 ± 0,02	a	0,63 ± 0,04	a	6,66 ± 0,65	a	15,79 ± 1,7	a
71	0	0	0,13 ± 0,02	a	0,55 ± 0,04	a	0,67 ± 0,05	a	0,77 ± 0,01	a	11,07 ± 2,27	a	22,94 ± 3,92	a
	10	14	1,05 ± 0,08	a	1,3 ± 0	a	0,66 ± 0,01	a	0,26 ± 0,08	b	4,51 ± 2,07	a	16,52 ± 4,4	a
	23	17	1,53 ± 0,36	a	1,2 ± 0	a	0,68 ± 0,04	a	0,61 ± 0,04	a	6,47 ± 0,77	a	22,3 ± 2,33	a
72	0	0	0,12 ± 0,02	a	0,71 ± 0,06	a	0,71 ± 0,03	a	0,78 ± 0,01	a	13,17 ± 0,62	a	29,59 ± 4,88	a
	10	14	0,92 ± 0,25	a	1,95 ± 0,53	a	0,61 ± 0,04	a	0,43 ± 0,13	a	4,31 ± 1,87	a	12,78 ± 2,66	a
	23	17	1,92 ± 0,33	b	1,1 ± 0	a	0,67 ± 0,03	a	0,71 ± 0,03	a	6,68 ± 1,02	a	17,74 ± 2,92	a
73	0	0	0,12 ± 0,03	a	0,53 ± 0,01	a	0,75 ± 0,03	a	0,73 ± 0,03	a	8,97 ± 0,68	a	27,67 ± 4,76	a
	10	14	0,63 ± 0,34	a	1,75 ± 0,29	a	0,52 ± 0,04	a	0,43 ± 0,09	a	5,61 ± 2,21	a	13,18 ± 3,19	a
	23	17	1,77 ± 0,29	b	0,8 ± 0	a	0,64 ± 0,04	a	0,71 ± 0,01	a	6,2 ± 1,71	a	21,09 ± 3,72	a
74	0	0	0,13 ± 0,03	a	0,6 ± 0,01	a	0,76 ± 0,01	a	0,77 ± 0,04	a	11,53 ± 1,29	a	27 ± 4,2	a
	10	14	0,25 ± 0,06	a	2,5 ± 0,16	b	0,54 ± 0,03	a	0,41 ± 0,06	a	7,96 ± 3,66	a	13,15 ± 2,97	a
	23	17	2 ± 0,15	b	1,4 ± 0	a	0,67 ± 0,05	a	0,67 ± 0,04	a	4,96 ± 0,71	a	20,47 ± 4,09	a
75	0	0	0,07 ± 0,02	a	0,51 ± 0,02	a	0,62 ± 0,09	a	0,74 ± 0,03	a	14,5 ± 2,86	a	24,16 ± 6,77	a
	10	14	0,4 ± 0,1	a	2,13 ± 0,63	b	0,64 ± 0,09	a	0,45 ± 0,12	a	5,41 ± 3,29	a	7,96 ± 1,13	a
	23	17	2,2 ± 0,45	b	1,45 ± 0	a	0,42 ± 0,06	a	0,68 ± 0,03	a	2,04 ± 0,16	a	22,96 ± 3,08	a
76	0	0	0,12 ± 0,04	a	0,59 ± 0,03	a	0,62 ± 0,1	a	0,78 ± 0,02	a	14,07 ± 1,91	a	17,46 ± 3,5	a
	10	14	0,3 ± 0,1	a	2,33 ± 0,14	b	0,63 ± 0,06	a	0,36 ± 0,05	b	6,09 ± 2,21	a	10,04 ± 2,64	a
	23	17	1,87 ± 0,29	b	1,2 ± 0	a	0,73 ± 0,02	a	0,73 ± 0,01	a	3,03 ± 0,72	a	22,05 ± 3,93	a
77	0	0	0,12 ± 0,04	a	0,65 ± 0,04	a	0,7 ± 0,04	a	0,78 ± 0,01	a	12,67 ± 1,67	a	17,96 ± 1,29	a
	10	14	0,52 ± 0,22	a	2,48 ± 0,26	b	0,61 ± 0,07	a	0,56 ± 0,03	a	5,28 ± 2,08	a	10,79 ± 3,89	a
	23	17	1,83 ± 0,15	b	0,7 ± 0	a	0,72 ± 0,03	a	0,36 ± 0,03	b	3,32 ± 1,23	a	11,06 ± 0,14	a

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge K.

Obravnavanje			Parameter											
			Vodni potencial (-MPa)						Potencialna fotokemična učinkovitost (Fv'/Fm')					
RI	Dan suše		$\bar{x} \pm SE$						$\bar{x} \pm SE$					
L	B	KI	BF			KIS			BF			KIS		
F	S													
78	0	0	0,12 ± 0,02	a	0,91 ± 0,13	a	0,64 ± 0,01	a	0,73 ± 0,02	a	11,3 ± 1,45	a	22,89 ± 5,94	a
	10	14	0,47 ± 0,17	a	2,3 ± 0,08	a	0,64 ± 0,09	a	0,39 ± 0,02	a	6,77 ± 2,38	a	56,38 ± 30,82	b
	23	17	1,85 ± 0,05	b	1,3 ± 0	a	0,62 ± 0,04	a	0,73 ± 0,03	a	3,28 ± 0,81	a	23,23 ± 2,73	a
79	0	0	0,2 ± 0,03	a	0,61 ± 0,02	a	0,76 ± 0	a	0,78 ± 0,01	a	29,55 ± 12,04	a	22,16 ± 2,14	a
	10	14	0,23 ± 0,04	a	0,88 ± 0,02	a	0,71 ± 0,04	a	0,48 ± 0,04	a	7,39 ± 3,41	a	49,37 ± 20,19	b
	23	17	1,95 ± 0,39	b	0,6 ± 0	a	0,18 ± 0,06	b	0,64 ± 0,07	a	1,02 ± 0,16	b	19,11 ± 2,98	a
80	0	0	0,17 ± 0,02	a	0,49 ± 0,12	a	0,76 ± 0,01	a	0,78 ± 0,03	a	22,4 ± 6,45	a	28,53 ± 2,93	a
	10	14	0,25 ± 0,03	a	3,5 ± 0	b	0,73 ± 0,04	a	0,39 ± 0,01	b	9,8 ± 2,95	a	23,78 ± 8,91	a
	23	17	2,3 ± 0,29	b	1,5 ± 0	a	0,74 ± 0,01	a	0,69 ± 0,03	a	7,74 ± 0,39	a	21,16 ± 3,67	a
81	0	0	0,18 ± 0,02	a	0,58 ± 0,02	a	0,72 ± 0,02	a	0,73 ± 0,02	a	15,73 ± 5,67	a	29,64 ± 3,41	a
	10	14	0,28 ± 0,06	a	1,65 ± 0,45	a	0,71 ± 0,06	a	0,45 ± 0,01	a	9,62 ± 5,29	a	31,66 ± 12,09	a
	23	17	3,15 ± 0,19	b	1,5 ± 0	a	0,64 ± 0,02	a	0,52 ± 0,11	a	11,1 ± 1,33	a	16,69 ± 1,46	a
82	0	0	0,15 ± 0,03	a	0,77 ± 0,21	a	0,75 ± 0,01	a	0,73 ± 0,02	a	16,05 ± 6,82	a	26,88 ± 2,58	a
	10	14	0,25 ± 0,03	a	2,83 ± 0,55	b	0,77 ± 0,06	a	0,46 ± 0,02	b	8,13 ± 3,96	a	29,68 ± 4,28	a
	23	17	2,52 ± 0,16	b	1,2 ± 0	a	0,67 ± 0,03	a	0,67 ± 0,03	a	13,84 ± 2,55	a	24,32 ± 1,4	a
83	0	0	0,12 ± 0,04	a	0,73 ± 0,1	a	0,76 ± 0	a	0,77 ± 0,01	a	20,5 ± 8,57	a	23,59 ± 3,4	a
	10	14	0,33 ± 0,09	a	2,8 ± 0,57	b	0,72 ± 0,01	a	0,41 ± 0,03	a	8,59 ± 2,35	a	17,55 ± 3,03	a
	23	17	2,47 ± 0,12	b	0,73 ± 0	a	0,66 ± 0,06	a	0,56 ± 0,02	b	9,54 ± 2	a	20,2 ± 0,18	a
84	0	0	0,13 ± 0,04	a	0,91 ± 0,14	a	0,67 ± 0,08	a	0,78 ± 0,01	a			20,28 ± 5,38	a
	10	14	0,72 ± 0,34	a	3,2 ± 0,24	b	0,75 ± 0,03	a	0,34 ± 0,02	b	9,3 ± 3,47	a	12,4 ± 1,86	a
	23	17	2,85 ± 0,3	b	1,25 ± 0	a	0,68 ± 0,04	a	0,39 ± 0,11	b	10,24 ± 1,6	a	19,25 ± 5,81	a
85	0	0	0,18 ± 0,08	a	0,69 ± 0,03	a	0,76 ± 0,02	a	0,74 ± 0,01	a	28,35 ± 16,7	a	23,45 ± 3,25	a
	10	14	0,2 ± 0,06	a	2,6 ± 0,73	b	0,78 ± 0,03	a	0,38 ± 0,06	a	8,16 ± 3,43	a	22,44 ± 4,57	a
	23	17	2,83 ± 0,34	b	1,05 ± 0	a	0,37 ± 0,07	a	0,5 ± 0,16	a	6,76 ± 2,92	a	21,47 ± 7,42	a

Se nadaljuje.

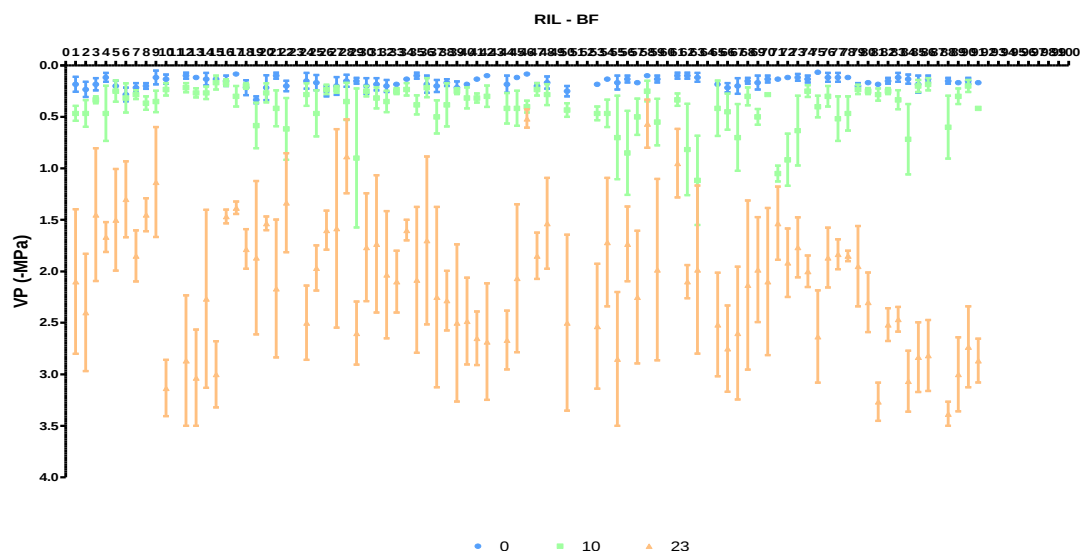
Nadaljevanje preglednice K.

Obravnavanje			Parameter											
			Vodni potencial (-MPa)				Potencialna fotokemična učinkovitost (Fv'/Fm')				ETR			
RI	Dan suše		$\bar{x} \pm SE$				$\bar{x} \pm SE$				$\bar{x} \pm SE$			
L	B	KI	BF		KIS		BF		KIS		BF		KIS	
F	S													
86	0	0	0,13 ± 0,03	a	0,78 ± 0,11	a	0,76 ± 0,02	a	0,74 ± 0,05	a	26,65 ± 16,37	a	22,23 ± 2,53	a
	10	14	0,18 ± 0,06	a	1,8 ± 0,24	a	0,76 ± 0,03	a	0,28 ± 0,05	b	7,24 ± 2,59	a	9,3 ± 1,54	a
	23	17	2,48 ± 0,34	b	1,2 ± 0	a	0,36 ± 0,15	b	0,43 ± 0,07	a	7,1 ± 3,25	a	18,54 ± 1,63	a
88	0	0	0,15 ± 0,03	a	0,7 ± 0,14	a	0,72 ± 0,03	a	0,71 ± 0,03	a	23,85 ± 14,82	a	22,3 ± 4,41	a
	10	14	0,6 ± 0,31	a	3,5 ± 0	b	0,75 ± 0,03	a	0,43 ± 0,1	a	6,81 ± 1,83	a	12,07 ± 0,75	a
	23	17	3,33 ± 0,12	b	1,7 ± 0	a	0,26 ± 0,09	b	0,34 ± 0,09	a	3,93 ± 1,69	a	13,93 ± 3,94	a
89	0	0	0,17 ± 0,02	a	0,88 ± 0,17	a	0,75 ± 0,02	a	0,72 ± 0,06	a	0,75 ± 9,2	a	35,08 ± 3,4	a
	10	14	0,3 ± 0,08	a	1,85 ± 0,04	a	0,75 ± 0,03	a	0,36 ± 0,04	a	6,28 ± 1,18	a	14,05 ± 3,87	a
	23	17	2,75 ± 0,36	b	3,5 ± 0	b	0,73 ± 0	a	0,52 ± 0,1	a	14,59 ± 3,8	a	20,14 ± 4,05	a
90	0	0	0,15 ± 0,03	a	0,7 ± 0,14	a			0,78 ± 0,02	a			27,57 ± 0,96	a
	10	14	0,2 ± 0,06	a	2,2 ± 0,24	b	0,76 ± 0,03	b	0,41 ± 0,13	a	7,01 ± 2,02	a	13,85 ± 1,29	a
	23	17	2,35 ± 0,39	b	2,2 ± 0	b	0,36 ± 0,07	a	0,6 ± 0,07	a	8,54 ± 2,18	a	27,37 ± 7,4	a
91	0	0	0,17 ± 0,02	a	0,58 ± 0,15	a			0,74 ± 0,03	a			19,57 ± 4,91	a
	10	14	0,42 ± 0,02	a	2,1 ± 0,24	b	0,72 ± 0,03	b	0,42 ± 0,07	a	3,94 ± 0,7	a	8,41 ± 0,64	a
	23	17	2,87 ± 0,21	b	1,05 ± 0	a	0,6 ± 0,02	a	0,5 ± 0,05	a	6,2 ± 2,21	a	18,54 ± 6,07	a

PRILOGA L1

Vpliv suše na vodni potencial, merjen v treh časovnih stopnjah sušnega stresa, pri 82 RIL navadnega fižola iz poskusa na BF.

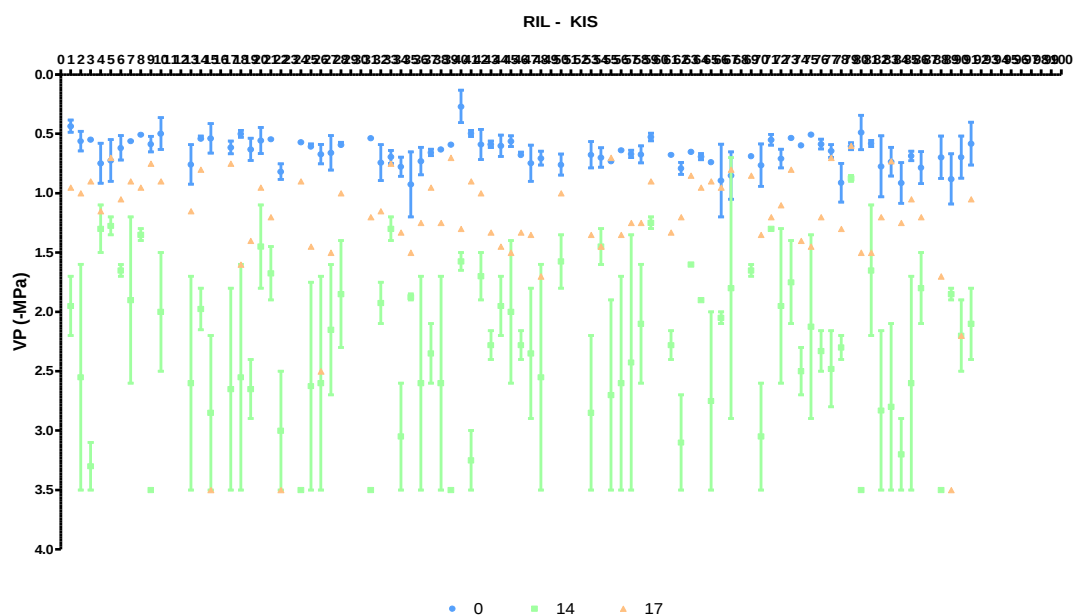
Appendix L1: The impact of drought on water potential measured at three time stages of drought stress in 82 RILs of common bean from experiment at BF.



PRILOGA L2

Vpliv suše na vodni potencial, merjen v treh časovnih stopnjah sušnega stresa, pri 82 RIL navadnega fižola iz poskusa na KIS.

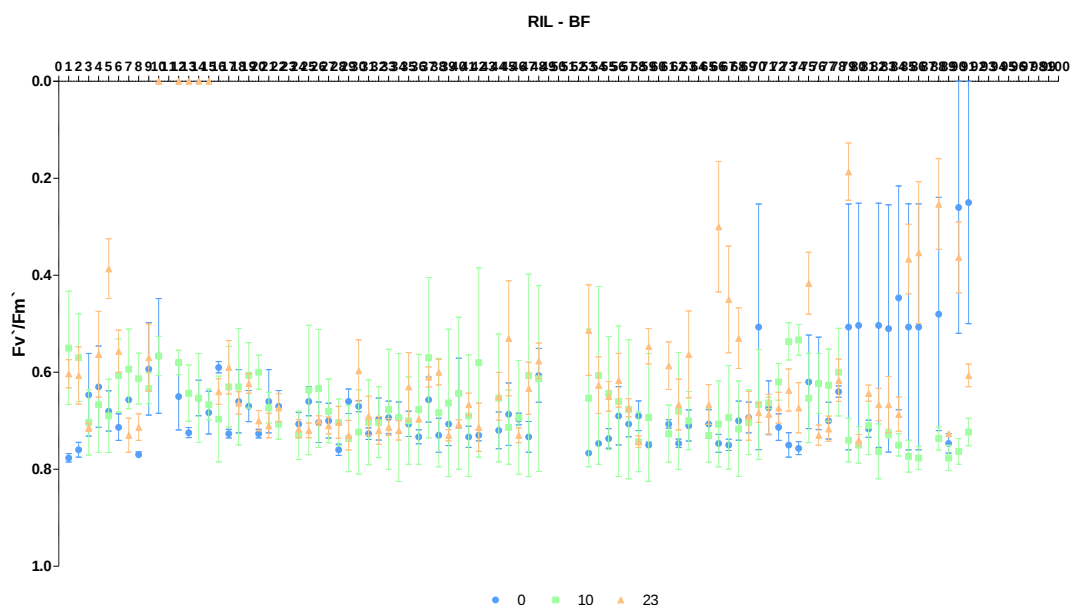
Appendix L2: The impact of drought on water potential measured at three time stages of drought stress in 82 RILs of common bean from experiment at KIS.



PRILOGA M1

Vpliv suše na potencialno fotokemično učinkovitost, merjeno v treh časovnih stopnjah sušnega stresa, pri 82 RIL navadnega fižola iz poskusa na BF.

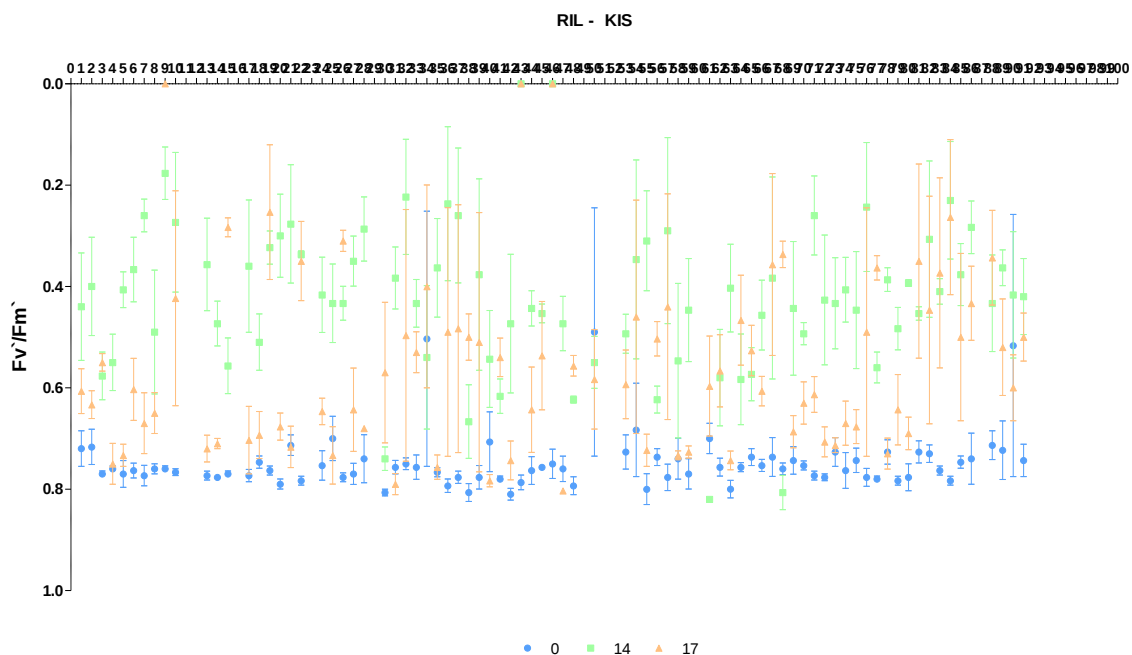
Appendix M1: The impact of drought on photochemical efficiency measured at three time stages of drought stress in 82 RILs of common bean from experiment at BF.



PRILOGA M2

Vpliv suše na potencialno fotokemično učinkovitost, merjeno v treh časovnih stopnjah sušnega stresa, pri 82 RIL navadnega fižola iz poskusa na KIS.

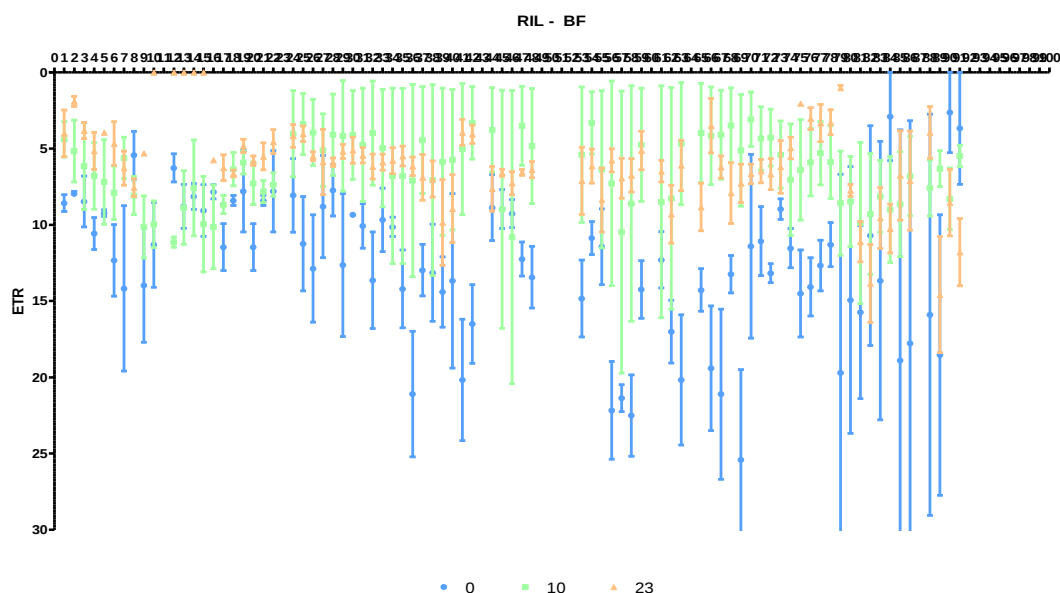
Appendix M2: The impact of drought on photochemical efficiency measured at three time stages of drought stress in 82 RILs of common bean from experiment at KIS.



PRILOGA N1

Vpliv suše na hitrost transporta elektronov, merjeno v treh časovnih stopnjah sušnega stresa, pri 82 RIL navadnega fižola iz poskusa na BF.

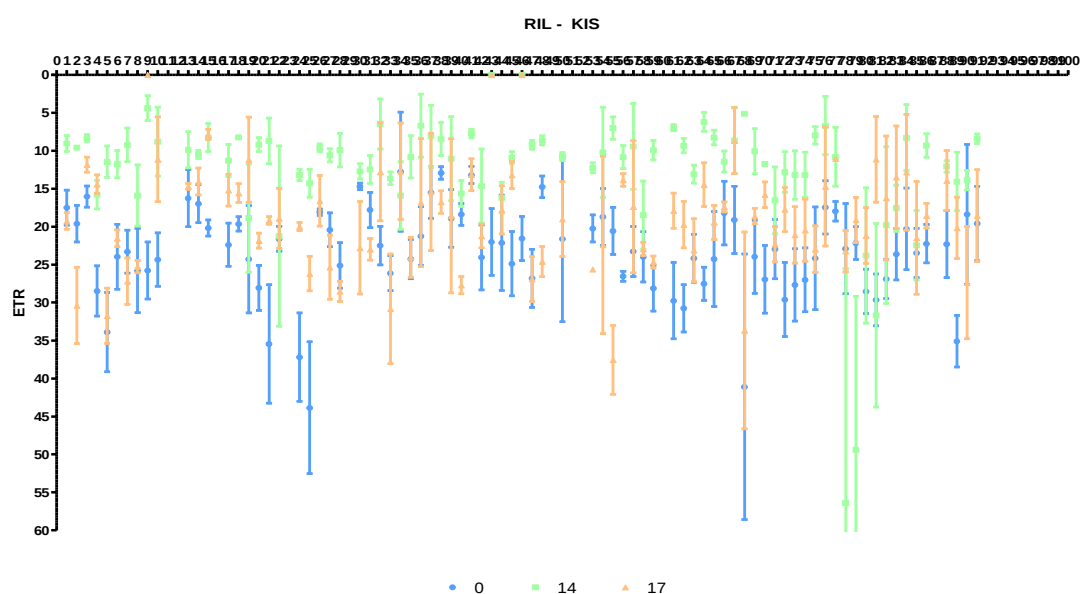
Appendix N1: The impact of drought on electron transport rate measured at three time stages of drought stress in 82 RILs of common bean from experiment at BF.



PRILOGA N2

Vpliv suše na hitrost transporta elektronov, merjeno v treh časovnih stopnjah sušnega stresa, pri 82 RIL navadnega fižola v poskusu na KIS.

Appendix N2: The impact of drought on electron transport rate measured at three time stages of drought stress in 82 RILs of common bean from experiment at KIS.



PRILOGA O

Segregacijski test markerjev za vezano kartiranje.

Appendix O: Test of marker segregation for linkage mapping.

Št.	Lokus/marker	a	b	-	χ^2	Df/Sp	Signif.	Klasifikacija
1	barva_stebila	62	16	4	27,13	1	*****	[a:b]
2	tip_rasti	49	20	13	12,19	1	*****	[a:b]
3	ATA6	25	55	2	11,25	1	*****	[a:b]
4	BM188	26	54	2	9,8	1	****	[a:b]
5	BMb654	27	54	1	9,00	1	****	[a:b]
6	ATA150	26	52	4	8,67	1	****	[a:b]
7	BMb182	52	26	4	8,67	1	****	[a:b]
8	BM205	25	49	8	7,78	1	***	[a:b]
9	BMb279	25	49	8	7,78	1	***	[a:b]
10	AFLP_6-10_T500	29	53	0	7,2	1	***	[a:b]
11	AFLP_9-2_T150	53	29	0	7,2	1	***	[a:b]
12	BMb519	50	27	5	6,87	1	***	[a:b]
13	PvM128	29	52	1	6,53	1	**	[a:b]
14	AFLP_6-7_S460	52	29	1	6,53	1	**	[a:b]
15	AFLP_1-2	51	29	2	6,5	1	**	[a:b]
16	BMb341	50	28	4	6,21	1	**	[a:b]
17	SSR-IAC47	50	28	4	6,21	1	**	[a:b]
18	AFLP_7-10_T170	52	30	0	5,9	1	**	[a:b]
19	barva_cveta	44	24	14	5,88	1	**	[a:b]
20	AFLP_8-1	45	25	12	5,71	1	**	[a:b]
21	AFLP_7-8_T210	51	30	1	5,44	1	**	[a:b]
22	BMb1157	44	25	13	5,23	1	**	[a:b]
23	AFLP_1-3	40	22	20	5,23	1	**	[a:b]
24	BM143	49	29	4	5,13	1	**	[a:b]
25	barva_semena	31	17	34	4,8	1	**	[a:b]
26	AFLP_7-6_T230	44	27	11	4,6	1	**	[a:b]
27	ATA76	31	49	2	4,5	1	**	[a:b]
28	BM239	30	48	4	4,15	1	**	[a:b]
29	BMd22	32	50	0	3,95	1	**	[a:b]
30	BM114	46	29	7	3,85	1	**	[a:b]
31	BM53	30	47	5	3,75	1	*	[a:b]
32	IAC88	38	24	20	3,16	1	*	[a:b]
33	BM142	46	31	5	2,92	1	*	[a:b]
34	BM152	34	47	1	2,9	1	-	[a:b]
35	BM236	34	47	1	2,9	1	-	[a:b]
36	BMb160	34	47	1	2,9	1	-	[a:b]

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge O.

Št.	Lokus/marker	a	b	-	χ^2	Df/Sp	Signif.	Klasifikacija
37	BMb356	34	47	1	2,9	1	-	[a:b]
38	AFLP_10-10_S230	47	34	1	2,9	1	-	[a:b]
39	AFLP_2-8	34	47	1	2,9	1	-	[a:b]
40	ATA9	32	47	3	2,85	1	*	[a:b]
41	BM154	32	47	3	2,85	1	*	[a:b]
42	SSR-IAC55	33	48	1	2,78	1	*	[a:b]
43	AFLP_10-8_T160	48	33	1	2,78	1	*	[a:b]
44	SSR-IAC10	45	31	6	2,58	1	-	[a:b]
45	SSR-IAC90	40	27	15	2,52	1	-	[a:b]
46	SSR-IAC62	34	48	0	2,39	1	-	[a:b]
47	ATA32	33	46	3	2,14	1	-	[a:b]
48	ATA172	46	33	3	2,14	1	-	[a:b]
49	BM212	33	46	3	2,14	1	-	[a:b]
50	BMb152	33	45	4	1,85	1	-	[a:b]
51	HRG	33	42	7	1,8	1	-	[a:b]
52	AFLP_5-11_S600	35	47	0	1,76	1	-	[a:b]
53	AFLP_9-2_S170	47	35	0	1,76	1	-	[a:b]
54	BMb83	26	34	22	1,7	1	-	[a:b]
55	AFLP_10-5_S260	30	41	11	1,7	1	-	[a:b]
56	BM156	33	44	5	1,57	1	-	[a:b]
57	BMb318	45	34	3	1,53	1	-	[a:b]
58	ME1	45	34	3	1,53	1	-	[a:b]
59	BMb414	35	44	3	1,3	1	-	[a:b]
60	BMd53	44	35	3	1,3	1	-	[a:b]
61	BMb619	35	45	2	1,25	1	-	[a:b]
62	GATS91	36	46	0	1,22	1	-	[a:b]
63	BM211	41	32	9	1,11	1	-	[a:b]
64	BMb1024	32	41	9	1,11	1	-	[a:b]
65	SSR-IAC6	28	36	18	1,00	1	-	[a:b]
66	AFLP_2-11_S100	36	45	1	1,00	1	-	[a:b]
67	AFLP_10-8_T330	45	36	1	1,00	1	-	[a:b]
68	AFLP_10-11_T150	45	36	1	1,00	1	-	[a:b]
69	BMb1093	6	10	66	1,00	1	-	[a:b]
70	IAC83c	35	43	4	0,82	1	-	[a:b]
71	BM150	36	44	2	0,80	1	-	[a:b]
72	BM187	44	36	2	0,80	1	-	[a:b]
73	BMd28	44	36	2	0,80	1	-	[a:b]
74	PVBR93	44	36	2	0,80	1	-	[a:b]
75	AFLP_9-5_S360	45	37	0	0,78	1	-	[a:b]

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge O.

Št.	Lokus/marker	a	b	-	χ^2	Df/Sp	Signif.	Klasifikacija
76	BM138	40	33	9	0,67	1	-	[a:b]
77	PVBR53	43	36	3	0,62	1	-	[a:b]
78	ATA244	37	44	1	0,60	1	-	[a:b]
79	BMd42	37	44	1	0,60	1	-	[a:b]
80	AFLP_3-8_S380	44	37	1	0,60	1	-	[a:b]
81	AFLP_10-10_S200	44	37	1	0,60	1	-	[a:b]
82	BMb474	35	41	6	0,47	1	-	[a:b]
83	GA16c	35	41	6	0,47	1	-	[a:b]
84	BM164	42	36	4	0,46	1	-	[a:b]
85	PVBR107	37	43	2	0,45	1	-	[a:b]
86	PvM002	37	43	2	0,45	1	-	[a:b]
87	AFLP_8-10	44	38	0	0,44	1	-	[a:b]
88	PVBR25	33	38	11	0,35	1	-	[a:b]
89	BM237	35	40	7	0,33	1	-	[a:b]
90	BMb611	43	38	1	0,31	1	-	[a:b]
91	BM202	32	36	14	0,24	1	-	[a:b]
92	BMg1888	35	39	8	0,22	1	-	[a:b]
93	BMb277	41	37	4	0,21	1	-	[a:b]
94	BMd25	36	40	6	0,21	1	-	[a:b]
95	BMb250	40	36	6	0,21	1	-	[a:b]
96	ATA3	38	42	2	0,20	1	-	[a:b]
97	BMb302	42	38	2	0,20	1	-	[a:b]
98	BM139	38	35	9	0,12	1	-	[a:b]
99	Bmc121	38	35	9	0,12	1	-	[a:b]
100	Bmc238	41	38	3	0,11	1	-	[a:b]
101	PVBR185	39	42	1	0,11	1	-	[a:b]
102	AFLP_10-5_S330	42	39	1	0,11	1	-	[a:b]
103	PvM018	21	19	42	0,10	1	-	[a:b]
104	BMb601	6	7	69	0,08	1	-	[a:b]
105	BM141	37	35	10	0,06	1	-	[a:b]
106	BM160	40	38	4	0,05	1	-	[a:b]
107	BM172	41	39	2	0,05	1	-	[a:b]
108	BMb445	39	41	2	0,05	1	-	[a:b]
109	PvM013a	41	39	2	0,05	1	-	[a:b]
110	PvM100	38	40	4	0,05	1	-	[a:b]
111	PvM120	37	39	6	0,05	1	-	[a:b]
112	AFLP_5-8_T350	42	40	0	0,05	1	-	[a:b]
113	ATA77	41	40	1	0,01	1	-	[a:b]
114	BM167	39	40	3	0,01	1	-	[a:b]

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge O.

Št.	Lokus/marker	a	b	-	χ^2	Df/Sp	Signif.	Klasifikacija
115	BM175	40	39	3	0,01	1	-	[a:b]
116	BMb1095	39	38	5	0,01	1	-	[a:b]
117	BMd26	35	36	11	0,01	1	-	[a:b]
118	BMg1526	38	37	7	0,01	1	-	[a:b]
119	SSR-IAC52	40	41	1	0,01	1	-	[a:b]
120	AFLP_6-11_T70	41	40	1	0,01	1	-	[a:b]
121	AFLP_9-2_T190	39	40	3	0,01	1	-	[a:b]
122	ATA113	38	38	6	0,00	1	-	[a:b]
123	ATA289	38	38	6	0,00	1	-	[a:b]
124	BM149	41	41	0	0,00	1	-	[a:b]
125	BM157	40	40	2	0,00	1	-	[a:b]
126	PvM003	38	38	6	0,00	1	-	[a:b]
127	AFLP_5-11_S200	41	41	0	0,00	1	-	[a:b]
128	BMb248	8	8	66	0,00	1	-	[a:b]

PRILOGA P1

Osnovni vremenski podatki za agrometeorološko postajo Drenov grič, za obdobje 17. 6.–12. 7. 2013, za poskus na BF. Dnevne temperature zraka (°C), povprečne minimalne in maksimalne dnevne temperature zraka (°C), povprečna dnevna relativna zračna vlaga (% RH), minimalna in maksimalna povprečna dnevna relativna zračna vlaga (% RH) ter povprečna dnevna količina padavin (mm).

Appendix P1: Basic weather data for agrometeorological station Drenov grič for a period of 17. 6 - 12. 7. 2013 attempt on BF. Daily air temperature (°C), the average minimum and maximum daily air temperature (°C), the average daily relative humidity (% RH), the minimum and maximum average daily relative humidity (% RH), and average daily rainfall (mm).

Datum	Št. meritev	Temperat ura (°C)	Temperat ura (°C)	Temperat ura (°C)	Relativna vlaga (%RH)	Relativna vlaga (%RH) (Min)	Relativna vlaga (%RH) (Max)	Padavine (mm)	Padavine (mm) (Min)	Padavine (mm) (Max)
17.6.2013	24	23,95	23,58	24,33	67,84	66,53	69,17	0,00	0,00	0,00
18.6.2013	24	25,21	24,83	25,61	66,95	65,58	68,31	0,00	0,00	0,00
19.6.2013	24	25,79	25,40	26,20	64,40	63,13	65,68	0,00	0,00	0,00
20.6.2013	24	24,67	24,26	25,07	61,13	59,60	62,65	0,00	0,00	0,00
21.6.2013	24	23,79	23,95	42,67	60,45	61,06	31,17	0,00	0,00	0,00
22.6.2013	24	22,19	21,88	22,49	64,81	63,36	66,24	0,00	0,00	0,00
23.6.2013	24	21,13	20,63	21,63	70,74	68,74	72,73	0,00	0,00	0,00
24.6.2013	24	13,88	13,64	14,14	90,70	89,40	92,01	0,58	0,18	0,41
25.6.2013	24	13,30	13,00	13,62	84,39	83,10	85,70	0,00	0,00	0,00
26.6.2013	24	13,20	12,90	13,50	83,33	82,21	84,48	0,16	0,03	0,13
27.6.2013	24	14,57	14,31	14,82	72,68	71,17	74,18	0,03	0,00	0,03
28.6.2013	24	12,60	12,23	12,97	76,38	74,66	78,09	0,01	0,00	0,01
29.6.2013	24	16,23	15,87	16,62	66,30	64,88	67,71	0,00	0,00	0,00
30.6.2013	24	17,95	17,68	18,26	65,84	64,73	66,95	0,00	0,00	0,00
1.7.2013	24	18,21	17,90	18,54	69,53	68,07	70,99	0,00	0,00	0,00
2.7.2013	24	19,62	19,23	20,01	67,25	65,84	68,66	0,00	0,00	0,00
3.7.2013	24	19,93	19,52	20,32	65,40	64,05	66,74	0,00	0,00	0,00
4.7.2013	24	20,40	20,03	20,76	68,11	66,72	69,49	0,00	0,00	0,00
5.7.2013	24	20,51	20,18	20,88	70,38	69,05	71,70	0,00	0,00	0,00
6.7.2013	24	19,93	19,47	20,39	72,88	71,50	74,25	0,00	0,00	0,00
7.7.2013	24	21,26	20,88	21,65	70,69	69,37	71,98	0,00	0,00	0,00
8.7.2013	24	22,26	21,92	22,60	66,58	65,18	68,02	0,00	0,00	0,00
9.7.2013	24	21,16	20,81	21,50	70,10	68,74	71,45	0,00	0,00	0,00
10.7.2013	24	20,36	19,93	20,80	75,93	74,19	77,64	0,00	0,00	0,00
11.7.2013	24	18,85	18,57	19,14	85,98	84,65	87,31	0,30	0,07	0,23
12.7.2013	24	19,11	18,84	19,38	72,12	70,74	73,48	0,00	0,00	0,00
POVPREČNO	24,00	19,62	19,29	20,69	71,19	69,85	71,41	0,04	0,01	0,03

PRILOGA P2

Osnovni vremenski podatki za agrometeorološko postajo KIS2, za obdobje 28. 5.–13. 6. 2014, za poskus na KIS. Dnevne temperature zraka (°C), povprečne minimalne in maksimalne dnevne temperature zraka (°C), povprečna dnevna relativna zračna vlaga (% RH), minimalna in maksimalna povprečna dnevna relativna zračna vlaga (% RH) ter povprečna dnevna količina padavin (mm).

Appendix P2: Basic weather data for agrometeorological station KIS2 for the period 28. 5. - 13. 6. 2014 attempt at KIS. Daily air temperature (°C), the average minimum and maximum daily air temperature (°C), the average daily relative humidity (% RH), the minimum and maximum average daily relative humidity (% RH), and average daily rainfall (mm) .

Datum	Št. meritev	Temperatura (°C)	Temperatura (°C) (Min)	Temperatura (°C) (Max)	Relativna vlaga (%RH)	Relativna vlaga (%RH) (Min)	Relativna vlaga (%RH) (Max)	Padavine (mm)	Padavine (mm) (Min)	Padavine (mm) (Max)
28.5.2014	24	14,67	14,28	15,05	73,38	71,38	75,58	0,43	0,03	0,30
29.5.2014	24	15,27	14,83	15,68	76,05	73,95	78,52	0,32	0,01	0,14
30.5.2014	24	13,91	13,70	14,17	76,57	75,15	77,78	0,01	0,00	0,01
31.5.2014	24	14,08	13,59	14,55	53,07	50,95	55,38	0,00	0,00	0,00
1.6.2014	24	14,16	13,67	14,77	61,68	58,96	64,42	0,01	0,00	0,01
2.6.2014	24	15,65	15,15	16,14	57,61	55,31	60,63	0,00	0,00	0,00
3.6.2014	24	14,40	13,78	15,03	71,63	68,53	74,48	0,03	0,00	0,03
4.6.2014	24	16,00	15,45	16,55	68,14	65,70	70,34	0,01	0,00	0,01
5.6.2014	24	17,46	17,13	17,80	70,78	68,64	72,90	0,06	0,00	0,05
6.6.2014	24	20,43	19,91	20,93	58,40	56,40	60,36	0,00	0,00	0,00
7.6.2014	24	22,42	21,84	23,08	51,63	49,26	53,67	0,00	0,00	0,00
8.6.2014	24	23,69	23,15	24,25	51,26	49,15	53,29	0,00	0,00	0,00
9.6.2014	24	24,73	24,21	25,25	51,11	49,08	53,23	0,00	0,00	0,00
10.6.2014	24	25,21	24,69	25,74	48,06	45,66	50,33	0,00	0,00	0,00
11.6.2014	24	25,81	25,18	26,43	46,83	44,45	49,24	0,00	0,00	0,00
12.6.2014	24	22,51	21,93	23,17	62,95	59,70	66,05	0,23	0,00	0,14
13.6.2014	24	20,62	20,15	21,10	72,25	69,84	74,63	0,09	0,01	0,04
POVPREČJE	24	18,88	18,39	19,39	61,85	59,54	64,17	0,07	0,00	0,04

PRILOGA P3

Osnovni podatki vremenskih razmer v obdobju april–september v letih 2013 in 2014 v primerjavi z dolgoletnim povprečjem 1961–1990 za Ljubljano Bežigrad. Povprečne mesečne temperature zraka (°C), povprečne minimalne in maksimalne mesečne temperature zraka (°C), minimalna in maksimalna povprečna mesečna relativna zračna vlaga (% RH) ter trajanje sončnega obsevanja (v urah) (ARSO, 2016; Mesečni ..., 2016).

Appendix P3: Basic weather data during the period from April to September in 2013 and 2014 compared to the long-term average from 1961 to 1990 for Ljubljana Bežigrad. Average monthly air temperature (°C), the average minimum and maximum monthly air temperature (°C), minimum and maximum average monthly relative humidity (% RH) and sunshine duration (in hours) (EARS, 2016; Monthly ..., 2016).

		Mesec							
		Apr	Maj	Jun	Jul	Avg	Sep		
Meteorološka postaja Ljubljana – Bežigrad	Leto	2013	Parameter						
			T povp (°C)	12,4	14,8	19,8	23,5	22,5	16,2
			T min (°C)	7,5	10,7	13,9	16,6	15,9	11,9
			T max (°C)	17,0	19,9	25,8	30,1	29,5	21,4
			RV min (%)	51,0	62,0	44,0	39,0	42,0	61,0
			RV max (%)	85,0	85,0	87,0	82,0	83,0	95,0
			Ure sončnega obsevanja	167,0	181,0	280,0	350,0	293,0	159,0
	2014	T povp (°C)	13,1	15,7	20,2	20,8	19,6	16,2	
		T min (°C)	8,3	10,1	14,1	15,8	15,2	12,3	
		T max (°C)	18,7	21,7	26,5	26,5	25,1	21,5	
		RV min (%)	53,0	48,0	48,0	58,0	87,0	65,0	
		RV max (%)	90,0	83,0	84,0	92,0	93,0	96,0	
		Ure sončnega obsevanja	159,0	233,0	257,0	211,0	199,0	125,0	
Dolgoletno povprečje 1961 – 1990	T povp (°C)	9,9	14,6	17,8	19,9	19,1	15,5		
	T min (°C)	4,7	9,0	12,4	14,1	13,8	10,9		
	T max (°C)	15,4	20,4	23,6	26,1	25,4	21,6		
	RV min (%)	52,9	51,9	54,5	51,6	53,9	59,0		
	RV max (%)	86,9	85,9	86,2	87,0	91,8	95,1		
	Ure sončnega obsevanja	162,0	210,0	221,0	260,0	230,0	164,0		

PRILOGA R

Genska karta Galeano-Fernandez, 2011.

Appendix R: Gene map of Galeano-Fernandez, 2011.

http://legumeinfo.org/traits_maps/cmap/?ref_map_set_acc=PvConsensus_GaleanoFernandez2011_a&ref_map_accs=-1

