

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Gašper TRČEK

**GENETSKA RAZNOLIKOST GENSKIH VIROV
SEZAMA (*Sesamum indicum* L.) IZ JV EVROPE**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Biotehnologije

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Gašper TRČEK

GENETSKA RAZNOLIKOST GENSKIH VIROV SEZAMA (*Sesamum indicum* L.) IZ JV EVROPE

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Biotehnologije

**GENETIC DIVERSITY AMONG SESAME (*Sesamum indicum* L.)
ACCESSIONS FROM SOUTH-EAST EUROPE**

M. SC. THESIS

Master Study Programmes – Biotechnology

Ljubljana, 2013

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija biotehnologije. Opravljeno je bilo na Oddelku za poljedelstvo, vrtnarstvo, genetiko in žlahtnjenje Kmetijskega inštituta Slovenije in na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Po sklepu komisije za študij 1. in 2. stopnje je bil 16. 2. 2012 za mentorja magistrskega dela potrjen izr. prof. dr. Vladimir Meglič, za recenzentko pa doc. dr. Nataša Štajner.

Komisija za oceno in zagovor:

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

Član: izr. prof. dr. Vladimir Meglič
Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za poljedelstvo in semenarstvo

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

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svoje magistrske naloge na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddal v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Gašper Trček

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
DK UDK 577.21:633.853.74(043.2)=163.6
KG sezam/*Sesamum indicum*/mikrosateliti/genetska raznolikost/deskriptorji/akcesije/
morfološka karakterizacija/genetske analize/genski viri
AV TRČEK, Gašper
SA MEGLIČ, Vladimir (mentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI 2013
IN GENETSKA RAZNOLIKOST GENSKIH VIROV SEZAMA (*Sesamum indicum* L.) IZ JV EVROPE
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP X, 51 str., 11 pregl., 8 sl., 5 pril., 72 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Sezam (*Sesamum indicum* L.) je rastlina iz družine Pedaliaceae. Cenjena je predvsem zaradi svojega kakovostnega in bogatega olja, razširjena je tudi uporaba celih semen. Genetska raznolikost akcesij sezama iz JV Evrope do sedaj še ni bila raziskana. Kot primerno orodje za tako študijo pa se kažejo mikrosateliti. Gre za tandemske ponavljajoča se zaporedja DNA, pri katerih je enota ponovitve dolga od 2–8 bp. Z uporabo mikrosatelitnih molekularnih markerjev smo opravili analizo genetske raznolikosti 51 pridobljenih genskih virov sezama. Podatke o mikrosatelitih smo analizirali z različnimi statističnimi programi. Izračuni kažejo solidni povprečni vrednosti PIC (0,466) in He (0,518) Analizirali smo parne primerjave genotipov in izrisali drevo standardnih genetskih razdalj med populacijami. Ugotovili smo, da je akcesije iz bližnjih geografskih območij mogoče razvrstiti v skupine, vendar so v nekaterih primerih genetsko blizu akcesije, ki izhajajo iz medsebojno oddaljenih območij. Drugi del naloge je bila analiza morfološke raznolikosti. Mlade rastline smo presadili in prenesli v rastlinjak. Ocenjevali smo jih po mednarodnih deskriptorjih. Sledila je obdelava podatkov z računalniškimi programi. Za numerične parametre ocene morfologije smo opravili analizo variance. Pri večini parametrov smo ugotovili visoko stopnjo variabilnosti med akcesijami in nizko znotraj akcesij. Nenumerični parametri, ki se tičejo osnovne morfologije, kažejo majhno variabilnost, pri bolj specialnih pa je le-ta višja. Na osnovi podatkov analize morfologije izrisan dendrogram ima v primerjavi z drevesom standardnih genetskih razdalj precej različno razporeditev akcesij. Mantelov test kaže šibko povezavo med genetsko in morfološko matriko ($r_{xy} = 0,132$).

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC UDC 577.21:633.853.74(043.2)=163.6
CX sesame/sesamum indicum/microsatellites/genetic diversity/descriptors/accessions/
morphological characterization/genetic analysis/genetic resources
AU TRČEK, Gašper
AA MEGLIČ, Vladimir (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
PY 2013
TI GENETIC DIVERSITY AMONG SESAME (*Sesamum indicum* L.)
ACCESSIONS FROM SOUTH-EAST EUROPE
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO X, 51 p., 11 tab., 8 fig., 5 ann., 72 ref.
IJ sl
JI sl/en
AB Sesame (*Sesamum indicum* L.) is a plant of a Pedaliaceae family. It is appreciated because of its oil quality and richness, and its whole seeds are widely used as well. Microsatellites are repeating sequences of 2-8 base pairs of DNA. They can be used as an effective tool in assessing the genetic diversity. This is the first study of genetic diversity among sesame accessions from South-East Europe. In this thesis we performed genetic analysis of 51 sesame accessions using microsatellite molecular markers. Microsatellite data were analyzed by various computer programs. Mean PIC value was 0,466 and mean He value was 0,518. We compared genotypes and analyzed the matching pares. We also constructed the tree of genetic relationships between populations using standard genetic distance. Accessions that originate from neighboring geographic regions are mostly grouped together, but in some cases geographically distant accessions are genetically very similar. The second part of the thesis was morphological characterization. Young sesame plants were transplanted and transferred to the greenhouse. We characterized plants using international descriptors. Obtained data were again processed by computer programs. Analysis of variance was performed on numerical descriptors. It mostly showed high variation among populations and low variation within populations. Non-numerical descriptors of basic morphology show low variability, while it is higher in case of descriptors of more detailed features. Dendrogram constructed on the base of processed data of morphological characterization shows quite different distribution of populations than the tree of genetic relationships between populations. Mantel test shows a weak correlation between morphological and genetic matrix ($r_{xy} = 0,132$).

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 SEZAM	4
2.1.1 Taksonomija	4
2.1.2 Izvor	4
2.1.3 Morfologija	4
2.1.4 Pogoji rasti	6
2.2 MIKROSATELITI	6
2.2.1 Mikrosatelitni markerski sistem	7
2.2.2 Problema ničtih alelov in homoplazije	7
2.2.3 Uporaba mikrosatelitnih markerjev pri rastlinah	8
2.3 DOSEDANJE GENETSKE ANALIZE SEZAMA	8
2.3.1 Študije z RAPD markerji	8
2.3.2 Študije z AFLP markerji	9
2.3.3 Študije s SSR markerji	9
2.4 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO	9
2.4.1 Ekonomično fluorescentno označevanje PCR – produktov	10
2.5 STATISTIČNA OBDELAVA RAZLIČNIH TIPOV PODATKOV MORFOLOŠKE KARAKTERIZACIJE	11
3 MATERIAL IN METODE	13
3.1 RASTLINSKI MATERIAL	13
3.1.1 Setev	13
3.2 ANALIZA GENETSKE RAZNOLIKOSTI	13

3.2.1 Priprava vzorcev in izolacija DNA	13
3.2.2 Preverjanje uspešnosti izolacije DNA	14
3.2.2.1 Agarozna gelska elektroforeza	15
3.2.2.2 Merjenje koncentracije DNA in redčenje vzorcev	15
3.2.3 PCR analiza	17
3.2.4 Preverjanje uspešnosti PCR analize	19
3.2.5 Priprava vzorcev za fragmentno analizo	19
3.2.6 Fragmentna analiza	20
3.2.7 Obdelava rezultatov fragmentne analize	20
3.2.8 Obdelava podatkov o mikrosatelitih s statističnimi programi	20
3.2.8.1 Excel Microsatellite Toolkit	21
3.2.8.2 FSTAT	21
3.2.8.3 Populations	21
3.2.8.4 TreeView	22
3.2.8.5 IDENTITY	22
3.3 ANALIZA MORFOLOŠKE RAZNOLIKOSTI	22
3.3.1 Presajanje	22
3.3.2 Zdravstveno stanje rastlin	23
3.3.3 Ocenjevanje	23
3.3.4 Obdelava podatkov	23
3.4 ANALIZA KORELACIJ GENETIKA – MORFOLOGIJA	24
4 REZULTATI Z RAZPRAVO	26
4.1 REZULTATI GENETSKE ANALIZE	26
4.1.1 Obravnava po lokusih	26
4.1.1.1 Lokus SSR-01	27
4.1.1.2 Lokus SSR-19	27
4.1.1.3 Lokus SSR-30	27
4.1.1.4 Lokus SSR-11	27
4.1.1.5 Lokus SSR-16	27
4.1.1.6 Lokus SSR-21	28
4.1.2 Parne primerjave genotipov	28

4.1.3 Obravnava po populacijah	30
4.2 REZULTATI MORFOLOŠKE KARAKTERIZACIJE	36
4.3 POVEZAVA GENETIKA – MORFOLOGIJA	40
4.3.1 Rezultat Mantelovega testa	40
5 SKLEPI	41
6 POVZETEK (SUMMARY)	43
6.1 POVZETEK	43
6.2 SUMMARY	44
7 VIRI	46
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Pregl. 1: Ločitev morfoloških deskriptorjev glede na tip podatkov s primeri in njihova definicija v programskem okolju R (Grum in Atieno, 2007: 20)	12
Pregl. 2: Informacije o parih začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabili kot osnovo pred njihovo modifikacijo (Pham, 2011: 36)	17
Pregl. 3: Modificirani pari začetnih oligonukleotidov, ki smo jih poleg univerzalnega fluorescentno označeni M13(-21) začetnega oligonukleotida uporabili za namnoževanje lokusov v PCR reakcijah	17
Pregl. 4: Globalni pregled dolžin alelov in njihovih frekvenc za vse lokuse	26
Pregl. 5: Globalni pregled parametrov variabilnosti po posameznih lokusih	26
Pregl. 6: Globalni pregled ujemanj genotipov	29
Pregl. 7: Skupine populacij/akcesij, v katerih se pojavljajo enaki genotipi	30
Pregl. 8: Dejanska heterozigotnost in povprečno število alelov/lokus znotraj populacij (akcesij)	32
Pregl. 9: Podatki genetske karakterizacije, prikazani po populacijah	35
Pregl. 10: Globalni statistični pregled nekaterih numeričnih podatkov morfološke karakterizacije	37
Pregl. 11: Globalni statistični pregled nekaterih nenumeričnih podatkov morfološke karakterizacije	38

KAZALO SLIK

	str.
Sl. 1: Rastline sezama	5
Sl. 2: Shematski prikaz fluorescentnega označevanja PCR produktov z uporabo univerzalnega fluorescentno označenega M13(-21) začetnega oligonukleotida (Schuelke, 2000: 233)	11
Sl. 3: Prikaz razporeditve reagentov na plošči za izolacije	14
Sl. 4: Izolacija DNA	16
Sl. 5: Vzgoja rastlin za morfološko karakterizacijo	24
Sl. 6: Porazdelitev parnih primerjav genotipov glede na število ujemajočih se alelov	29
Sl. 7: Drevo standardnih genetskih razdalj med populacijami	33
Sl. 8: Dendrogram, v katerem so populacije razvrščene glede na stopnjo morfološke različnosti	39

KAZALO PRILOG

- PRILOGA A:** Seznam v nalogi uporabljenih akcesij s podatki o njihovem poreklu in kratičnimi oznakami, ki smo jih v nalogi uporabili
- PRILOGA B:** Protokoli za pripravo nekaterih pufrov, ki smo jih uporabili v sklopu analize genetske variabilnosti pri delu z DNA
- PRILOGA C:** Celoten pregled dejanske heterozigotnosti in povprečnega števila alelov/lokus znotraj populacij (akcesij)
- PRILOGA D:** Pregled vrednosti analize variance ANOVA za nekatere numerične deskriptorje
- PRILOGA E:** Pregled morfološke karakterizacije z vrednotmi vseh deskriptorjev za vse akcesije

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Alel	alternativna oblika gena oz. določenega DNA zaporedja na določenem mestu v kromosomu
AFLP	polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov (angl. amplified fragment length polymorphism)
bp	bazni par
cDNA	angl. complementary DNA
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTPs	dioksinukleotid trifosfati
EST	oznake izraženih zaporedij (angl. Expressed sequence tags)
He	pričakovana heterozigotnost
Ho	dejanska heterozigotnost
ISSR	angl. inter simple sequence repeats
Lokus	mesto na kromosomu
OF ₀	ocena frekvence ničtih alelov
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
PI	verjetnost enakosti genotipov (angl. probability of identity)
PIC	informacijska vrednost polimorfizma (angl. polymorphic information content)
RAPD	naključno pomnožena polimorfna DNA (angl. random amplified polymorphic DNA)
SSRs	enostavna zaporedja (angl. short/simple sequence repeats), drugo ime za mikrosatelite
STRs	kratke tandemske ponovitve (angl. short tandem repeats), drugo ime za mikrosatelite
Taq polimeraza	DNA polimeraza termofilne bakterije <i>Thermus aquaticus</i>
VNTRs	spremenljivo število tandemskih ponovitev (angl. variable number of tandem repeats), drugo ime za mikrosatelite

1 UVOD

Sezam (*Sesamum indicum* L.) je enoletna rastlina, ki spada v družino Pedaliaceae. Velja za najstarejšo oljnico, saj jo človek goji že več kot 5000 let (Bisht in sod., 1998). Dandanes ga gojijo predvsem v tropskih in subtropskih predelih sveta. Cenjen je zaradi svojega kakovostnega in bogatega olja, katerega delež v semenih sezama dosega vrednosti do 60 % (Pham in sod., 2010). Široka pa je tudi uporaba celih semen.

Svetovna produkcija sezama je v letu 2011 po podatkih FAOSTAT-a znašala cca 4,1 milijona ton, sezamovim poljem pa je bilo namenjenih dobrih 6,6 milijona hektarjev. Čeprav Evropa ne pokrije niti desetinke odstotka svetovne produkcije, beležijo v Italiji najvišjo donosnost na hektar v svetovnem merilu (FAOSTAT ..., 2013). V Sloveniji se zaenkrat sezama praktično ne prideluje.

Kljub temu, da se sezamovo seme pogosto uporablja kot sestavina mnogih prehranskih izdelkov, najbolj običajno kot posip krušnim izdelkom, je večji del pridelanega semena usmerjen v produkcijo olja ali pa gre v mletje (Morris, 2002). Sezamovo olje vsebuje veliko antioksidantov, kar med drugim podaljšuje rok njegove uporabnosti. Poleg tega pa je bogato z mono in polinenasičenimi maščobnimi kislinami (Uzun in sod., 2008). Sezamova moka pa je proteinsko bogata, pri čemer ima visoko vsebnost esencialnih aminokislin metionina in triptofana, vsebuje tudi 10 do 12 % olj in trikrat več kalcija kot mleko (Morris, 2002) in kot taka predstavlja zelo kvalitetno krmo za živali. Potencialni problem pri uporabi sezamovih semen, olja in moke pri ljudeh pa lahko predstavlja njihova alergičnost. Alergije na sezam so na splošno v populaciji razmeroma redke a pogoste pri ljudeh, ki imajo alergije na katere druge prehranske izdelke ali živila (Sicherer in sod., 2010).

Ker so sezamova semena bogata z nenasičenimi maščobnimi kislinami ter vitamini in minerali (npr. kalcij, magnezij, fosfor), sezamovo olje pozitivno vpliva na zdravje (povezujejo ga z zmanjšanjem holesterola v krvi in krvnega tlaka ter koristnimi vplivi pri zmanjšanju nastanka srčno-žilnih obolenj) in se uporablja tudi v farmacevtske namene. Sezamovo olje poleg vitamina E vsebuje še več pomembnih antioksidantov, kot sta sezamin in sesamol, ki pozitivno vplivata na tkivo v oksidativnem stresu (Morris, 2002). Zato se je tudi samo sezamovo olje tradicionalno uporabljalo kot farmacevtski pripomoček pri zdravljenju bolezni zob in dlesni ter kožnih obolenj (Chakraborty in sod., 2008). Uporablja pa se ga tudi zgolj za sproščanje kot masažno olje, in sicer v kozmetiki (Anilakumar in sod., 2010).

Sezamovo olje se uporablja tudi v produkcijo barv, topil in mil (Bedigan, 2004). Zaradi vsebnosti primernih aromatskih spojin sezamove cvetove koristijo pri produkciji parfumov (Morris, 2002). Raziskave pa potekajo tudi v smeri uporabe sezamovega olja kot biogoriva (Saydut in sod., 2008).

Pri gojenju sezama je opaziti, da le-ta stimulatивно deluje na mikrofloro v tleh, ob tem pa vpliva na zmanjšanje populacij nekaterih nematod. Zaradi bogatega koreninskega sistema je po žetvi na polju prst bolj rahla, ostane pa tudi veliko koreninske biomase, ki pripomore njenemu bogatenju (Hagan in sod., 1998).

Zaradi vseh svojih pozitivnih lastnosti ter svoje pomembne vloge na trgu se sezamu namenja čedalje več znanstvenih študij, ki so nekoliko v zaostanku v primerjavi z nekaterimi drugimi kmetijskimi rastlinami (npr. koruza, trta), kar bi morda lahko pripisali dejstvu, da ima sezam v splošnem večjo vlogo (po tradiciji uporabe kot tudi po pridelavi) v tehnološko manj razvitem svetu. Vendar se, kot rečeno, tudi pri raziskavah sezama stvari premikajo čedalje hitreje. Tako so Wei in sod. (2011) že opravili obširno analizo sezamovega transkriptoma, Zhang in sod. (2013) pa so pred kratkim poročali o zagonu projekta za pridobitev nukleotidnega zaporedja genoma sezama (*Sesamum indicum* L.).

Študije genetske raznolikosti so zanimive že same po sebi, saj nam njihovi rezultati dajejo vpogled v pestrost in sorodnost preiskovanih organizmov oziroma osebkov, vendar imajo te študije seveda še globlje pomene in vzroke. Genetska pestrost rastlin ima pomembno vlogo pri trajnostnem razvoju in prehranski varnosti (Esquinas-Alcázar, 2005), saj že sama po sebi omogoča gojenje rastlin v prisotnosti različnih biotskih in drugih stresnih dejavnikov. S pomočjo poznavanja genetske raznolikosti pa lahko pridelavo pridelkov glede na okoljske dejavnike optimiramo, ali vsaj znatno izboljšamo. Tako se ta znanja uporabljajo pri selekciji rastlin v žlahtniteljskih programih za namene izboljšanja rastlinskih sort.

Dele genomske DNA, na katerih se tandemske ponavljajo 2–8 bp dolga zaporedja DNA, imenujemo mikrosateliti. Zaradi razmeroma široke pojavnosti v genomih višjih organizmov in relativno visoke mutacijske stopnje mikrosatelitov se le-te s pridom uporablja kot molekularne genetske markerje, med drugim tudi za namene določanja genetske raznolikosti genskih virov (Armour in sod., 1999).

Diverziteta se lahko okarakterizira tudi na podlagi morfologije s pomočjo morfoloških markerjev, ki so sicer običajno manj zanesljivi od genetskih, saj so večinoma precej odvisni od okoljskih dejavnikov in posledično ne tako standardno enoznačni. Vseeno pa z morfološko karakterizacijo pridobimo veliko količino uporabnih podatkov, s katerimi lahko obogatimo podatke genetske karakterizacije in morda v zaključkih pridemo korak dlje. Take asociacijske študije so zadnje čase vedno bolj pogoste (Wang in sod., 2012; Iwata in sod., 2013) in še posebej uporabne za žlahtniteljske programe (Collard in Mackill, 2007).

Do sedaj so bile pri sezamu opravljene študije genetske raznolikosti številnih akcesij z različnih predelov sveta, predvsem Afrike in Azije. Podobna študija na akcesijah sezama z JV Evrope pa še ni bila opravljena. Ob vse večjih podnebnih spremembah se nakazuje

možnost gojenja sezama tudi v naših pridelovalnih razmerah, zato bi bilo s testiranjem akcesij Jugovzhodne Evrope moč dobiti sliko o primernosti njihovega gojenja v Sloveniji.

Cilji magistrske naloge so bili opredelitev genetske raznolikosti genskih virov sezama iz JV Evrope s pomočjo mikrosatelitnih genetskih markerjev in morfološka karakterizacija taistih genskih virov. Nadalje je bil namen poiskati morebitne asociacije med pridobljenimi podatki obeh analiz.

Delovne hipoteze, ki smo si jih pri tem postavili, so bile:

- Na podlagi morfoloških in genetskih markerjev bo mogoče akcesije razvrstiti (v skupine).
- Velika morfološka in genetska variabilnost.
- Akcesije, ki izhajajo iz geografsko bolj oddaljenih območij, se bodo genetsko bolj razlikovale.
- Razvrščanje akcesij v podobne skupine na podlagi morfoloških in genetskih podatkov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 SEZAM

2.1.1 Taksonomija

Sezam (*Sesamum indicum* L.) spada v družino Pedaliaceae, ki je razmeroma majhna, saj vsebuje 16 rodov in znotraj njih 60 rastlinskih vrst (Ellis in sod., 1985).

Rod *Sesamum* sestavlja več vrst, od katerih je najbolj razširjena prav *Sesamum indicum* L. (Ashri, 1998). Kobayashi in sod. (1990) navajajo, da je bilo sicer v rodu *Sesamum* identificiranih 36 vrst, od katerih je bilo 22 najdenih v Afriki, 5 v Aziji, ostale pa po drugih predelih sveta.

Glede na citogenetiko so vrste rodu *Sesamum* razdeljene na tri skupine. V prvi, kjer $2n$ predstavlja 26 kromosomov, so poleg vrste *Sesamum indicum* L. še *S. alatum*, *S. capense*, *S. malabaricum*, v drugi skupini, za katero velja $2n = 32$ so vrste *S. prostratum*, *S. laciniatum*, *S. angolense*, *S. angustifolium*, *S. latifolium* v tretji skupini, kjer je $2n = 64$ pa je npr. vrsta *S. radiatum*. Predvsem zaradi razlik v številu kromosomov med temi tremi skupinami je medvrstno križanje precej omejeno, kar otežuje prenos želenih lastnosti, kot so odpornost na sušo, škodljivce in bolezni iz divjih sorodnikov na gojeni sezam (*Sesamum indicum* L.) s pomočjo medvrstnega križanja (Descriptors ..., 2004).

2.1.2 Izvor

Glede geografskega centra izvora sezama se kot najverjetnejši kažeta dve tezi. Prva predpostavlja izvorni center v vzhodni Afriki, saj je v tej regiji endemičnih največ divjih sorodnikov sezama (Nayar in Mehra, 1970), druga predpostavka pa govori o centru izvora na indijski podcelini (Bedigan in Harlan, 1986), kjer naj bi sezam tudi prvič udomačili. Na območju današnjega Pakistana so namreč našli ostanke zoglelenih semen sezama, starih okoli 5000 let (Tengberg, 1999). Z indijske podceline naj bi sezam kasneje tudi razširil po sosednjih geografskih območjih (Bedigan, 2004). Danes se ga široko goji predvsem za namene pridobivanja olja v Indiji, na Kitajskem, v Koreji, Turčiji, na Japonskem in Tajskem, nekaj pa tudi v južnejših evropskih državah (Italija, Makedonija, Grčija) (FAOSTAT ..., 2013).

2.1.3 Morfologija

Morfologija sezama je glede na sorto in okoljske pogoje lahko zelo raznolika. Gre za enoletnice z rastno dobo od 70 do 150 dni (Ashri, 1998). Višina rastlin je običajno med 0,5 m in 1 m, nekatere sorte pa lahko zrastejo tudi do 2 m. Način rasti rastlin je v večini primerov nedeterminanten (glavni poganjek raste neomejeno, se pravi, da se njegova rast

ne konča s cvetom), čeprav se najdejo tudi sorte z determinantnim tipom rasti. Cvetovi zvonaste oblike, ki se razvijejo pri 6 do 8 tednov starih rastlinah so lahko beli ali pa obarvani prek rožnatih do vijoličnih ali celo rdečih odtenkov (Descriptors ..., 2004). Sezam je sicer samoprašnica, vendar opažen nivo navzkrižne oprašitve variira na zelo širokem območju od praktično 0 pa tudi do 50 odstotkov (Bedigan in sod., 1986). Po uspešni oprašitvi se črna, rjava ali bela semena razvijejo v kapsulah, ki se ob primerni zrelosti odprejo (Ashri, 1998).



Slika 1: Rastline sezama

A – rastline sezama med cvetenjem, B – cvetova sezama, C – semenski kapsuli

2.1.4 Pogoji rasti

Sezam najbolje uspeva v okoljih tropskega in subtropskega podnebne pasu. Raste na več tipih tal, najbolje na dobro dreniranih, zmerno gnojenih s pH med 5.5 in 7.0. Sicer je sezam precej odporen na sušo in vročino (Ashri, 1998) po drugi strani pa ima zanimivo nizko toleranco na sol (Maas, 1993). Kljub temu ima vlaga velik pomen v času sajenja in pred cvetenjem, poleg tega pa je občutljiv na preveč mokre pogoje (Sesame ..., 2012).

2.2 MIKROSATELITI

Mikrosateliti predstavljajo enega od treh razredov satelitne DNA, ki je sestavljena iz tandemske ponavljajočih se zaporedij DNA, ki so v številnih kopijah prisotna v genomu višjih organizmov. Glede na dolžino ponovitve so ta zaporedja razporejena v naslednje razrede:

- sateliti (enota ponovitve dolga nekaj tisoč baznih parov),
- minisateliti (enota ponovitve daljša od 10 bp),
- mikrosateliti (enota ponovitve dolga od 2–8 bp) (Armour in sod., 1999).

Skozi zgodovino so se za mikrosatelite pojavila še nekatera imena, uveljavile so se predvsem njihove kratke različice med drugim: SSRs – angl. short sequence repeats (enostavna zaporedja), STRs – angl. short tandem repeats (kratke tandemske ponovitve) in VNTRs – angl. variable number of tandem repeats (spremenljivo število tandemskih ponovitev) (Štajner, 2010).

Mikrosatelite lahko razdelimo na popolne (so sestavljeni samo iz enega motiva osnovne ponovitve, ki se ponavlja brez prekinitev, npr. ctctctctctctctctctct), nepopolne (pri teh ena ali več ponovitev vsebuje bazo, ki ne odgovarja osnovnemu motivu ponovitve, npr. ctctctctctctgtctct), prekinjene (ki vsebujejo krajšo insercijo baznih parov, ki se ne ujemajo z osnovnim motivom ponovitve, npr. ctctctctctctgggctctctctct) in sestavljene (ti vključujejo dva ali več mikrosatelitov, ki pa se med seboj razlikujejo po tipu ali motivu ponovitve, npr. ctctctctgatgatgatgat) (Štajner, 2010).

Mikrosateliti nastanejo iz regij prikritih zaporednih ponovitev (angl. cryptic simplicity). S slednjim izrazom označujemo predele DNA, kjer so različni enostavni ponavljajoči se motivi DNA zaporedij prisotni v nadpovprečni meri (Tautz in sod., 1986, cit. po Štajner, 2010). Do medsebojne variabilnosti pri mikrosatelitih večinoma pride zaradi zdrsa DNA polimeraze in posledično nepravilnega parjenja med replikacijo (SSM – slipped strand mispairing) (Levinson in Gutman, 1987, cit. po Štajner, 2010) ter nepopolnega DNA replikacijskega popravilnega mehanizma (Strand in sod., 1993, cit. po Štajner, 2010).

2.2.1 Mikrosatelitni markerski sistem

Mikrosateliti se izkažejo za dobre genetske markerje, saj so mikrosatelitni lokusi v evkariontskih genomih dokaj številni, visoko polimorfni in razmeroma enakomerno razporejeni po genomu (Oliveira in sod., 2006). Poleg tega so mikrosatelitni markerji visoko informativni (so kodominantni markerji), lokusno specifični in učinkoviti (možnost multipleks PCR (Merdinoglu in sod., 2005)), metodolgija uporabe pa je enostavna (Selkoe in Toonen, 2006).

Problematičen je predvsem razvoj mikrosatelitnih markerjev, saj je drag, dolgotrajen in v primeru več vrst lahko tudi neuspešen (Selkoe in Toonen, 2006).

Zaradi svojih lastnosti se mikrosatelitni markerji s pridom široko uporabljajo pri populacijskih študijah, genskem mapiranju, sorodstvenih študijah v rastlinski (Biton in sod., 2012) in živalski genetiki (Chistiakov in sod., 2006) pa tudi v forenziki (Montinaro in sod., 2012).

2.2.2 Problema ničtih alelov in homoplazije

Iz same narave mikrosatelitov izhajata pojava ničtih alelov in homoplazije, ki sta do neke mere problematična, saj lahko privedeta do napačne interpretacije rezultatov mikrosatelitne analize (Štajner, 2010).

V obrobni regiji mikrosatelitskih lokusov so mutacije pogoste (Orti in sod., 1997), kar ima lahko za posledico nastanek ničtih alelov. To so aleli, ki se pri verižni reakciji s polimerazo ne namnožijo. Gre za to, da zaradi substitucij, insercij in delecij v obrobni regiji mikrosatelita začetni oligonukleotidi ne prepoznajo mest prileganja in reakcija ne poteče. Pride do lažne smrti mikrosatelita oziroma do nastanka ničtega alela (Callen in sod., 1993).

Mikrosateliti so običajno na osnovi različne strukture in zgodovine nastanka različno dolgi, vendar pa obstajajo tudi aleli enake dolžine, ki so strukturno in evolucijsko popolnoma različni. Ta pojav imenujemo homoplazija. Na genskem nivoju je homoplazija torej pojav, ko sta dva alela identična po svoji pojavnosti obliki (dolžini), ne pa tudi po izvoru (Estoup in sod., 1999). Problem je v tem, da se variabilnost mikrosatelitov običajno vrednoti po dolžinah namnoženih PCR produktov. Tako lahko gre pri alelih enake dolžine bodisi za homoplastične, bodisi za homologne alele, kar iz same dolžine ni moč razbrati. Seveda pa je pri potencialni zamenjavi pojava interpretacija rezultatov napačna (Štajner, 2010).

2.2.3 Uporaba mikrosatelitnih markerjev pri rastlinah

Med klasične primere koriščenja mikrosatelitnih markerjev pri preučevanju rastlin spadajo uporabe v namene identifikacije sort (Ahmad in sod., 2004; Mackay in sod., 2008), ocen genetske variabilnosti (Gaudeul in sod., 2004; Flajoulot in sod., 2005) in sorodstvenih odnosov (He in sod., 2003; Biton in sod., 2012), koristni so za pomoč pri upravljanju in ravnanju z genskimi viri v genskih bankah (Spoonier in sod., 2005; Dixit in sod., 2005), uporabljajo pa jih tudi za kartiranje genomov (Kenis in Keulemans, 2005; Varshney in sod., 2005) in kot pripomoček za potrebe žlahtniteljskih programov (Van Inghelandt, 2010; Jenkins in sod., 2012).

2.3 DOSEDANJE GENETSKE ANALIZE SEZAMA

Kljub svetovno precejšnji pomembnosti sezama kot kmetijske rastline je objav o študijah z molekularnimi markerji pri sezamu manj kot bi morda pričakovali. Začnejo se s poročili o RAPD (angl. random amplified polymorphic DNA) markerjih (Bhat in sod., 1999), nadaljujejo z objavami o ISSR (angl. inter simple sequence repeats) (Kim in sod., 2002) ter končajo pri AFLP (angl. amplified fragment length polymorphism) (Laurentin in Karlovsky, 2006) in mikrosatelitnih markerjih (Dixit in sod., 2005). Zaporedje poročil je na nek način logično, saj je za RAPD tehniko značilna razmeroma nizka cena razvoja, vendar je pri RAPD markerjih vprašljiva ponovljivost rezultatov, problem, ki ga odpravijo AFLP markerji. Tudi mikrosatelitni markerji imajo visoko ponovljive rezultate in so zaradi lastnosti, ki so omenjene v prejšnjih odstavkih, široko uporabni, a je njihov razvoj drag in zahteven (Schlötterer, 2004).

2.3.1 Študije z RAPD markerji

V študiji, ki so jo objavili Ercan in sod. (2004), se je z uporabo RAPD markerjev pri analizi turških sezamovih akcesij izkazalo, da so DNA markerji bolj senzitivni na variabilnost v povezavi z geografskim izvorom kot alocimski markerji. RAPD analiza je odkrila visoko stopnjo variabilnosti z uporabo omejenega števila začetnih oligonukleotidov, kar, kot menijo Ercan in sod. (2004), kaže na možnost uporabe RAPD tehnike za proučevanje sistematike sezama za potrebe genskih bank in učinkovito selekcijo starševskih rastlin v žlahtniteljskih programih.

Do podobnih zaključkov o visoki variabilnosti, ki jo je mogoče zaobjeti z uporabo omejenega števila začetnih oligonukleotidov, so z enako metodo prišli tudi Abdellatef in sod. (2008) pri študiji sudanskega sezama, pri tem pa izpostavili tudi potrebo za razvoj novih markerjev, kot so mikrosateliti.

Tabatabaei in sod. (2011) so z uporabo RAPD tehnike analizirali iranske akcesije sezama. Poleg genetske analize pa so akcesijam, vključenim v študijo, okarakterizirali tudi

morfološke, fenološke in reproduktivne lastnosti. Pri primerjavi med rezultati genetske analize in morfološke karakterizacije poročajo o opaženi korelaciji, ki pa je šibka.

2.3.2 Študije z AFLP markerji

V skladu z ugotovitvami, ki so jih podali Ercan in sod. (2004) v prej omenjeni RAPD analizi turškega sezama in Tabatabaei in sod. (2011), ki so proučevali iranski sezam, so Ali in sod. (2007) pri AFLP analizi 96 sezamovih akcesij z različnih delov sveta ugotovili, da med skupinami, ki so jih formirali na podlagi AFLP vzorcev in njihovim geografskim poreklom v večini primerov obstaja povezava, prav tako pa so našli povezavo tudi med AFLP vzorci in morfološkimi karakteristikami akcesij, kot so vejanje, število cvetov, tip kapsule in barva semenske ovojnice.

V nasprotju z njimi Laurentin in Karlovsky (2006) pri analizi indijskih, afriških, kitajskih, korejskih in japonskih akcesij sezama z AFLP markerji nista našla posebne povezave med geografskim poreklom akcesij in njihovimi AFLP vzorci.

2.3.3 Študije s SSR markerji

Dixit in sod. (2005) so prvi poročali o razvoju mikrosatelitnih markerjev pri sezamu, ki so jih razvili za potrebe Korejske genske banke. Podatkov o nukleotidnem zaporedju genoma še ni, se pa kažejo premiki. Konec januarja letos je namreč izšlo poročilo o formiranju delovne skupine, katere cilj je pridobiti in urediti nukleotidno zaporedje genoma sezama (*Sesamum indicum* L.) (Zhang in sod., 2013). Zato so Dixit in sod. (2005) za izdelavo začetnih oligonukleotidov uporabili zaporedja DNA iz genomskih knjižnic, obogatenih z mikrosateliti.

Drugačen pristop so uporabili Wei in sod. (2008), ki so mikrosatelitne markerje pri sezamu razvili na podlagi dostopnih podatkov o nukleotidnih zaporedjih, ki jih imenujemo oznake izraženih zaporedij, ali s kratico EST (angl. Expressed sequence tags), ki so zaporedja pridobljena z enkratnim določanjem nukleotidnega zaporedja (angl. single pass sequencing) knjižnic cDNA (angl. complementary DNA).

2.4 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO

Mikrosateliti se iz genoma lahko izolira z namnožitvijo znanih lokusov z verižno reakcijo s polimerazo (PCR – angl. polymerase chain reaction). Le-ta predstavlja eno najpomembnejših tehnik na področju molekularne biologije. Iznasel jo je Kary Mullis leta 1983 in po optimizaciji metode z uporabo termostabilne *Taq* polimeraze je verižna reakcija s polimerazo dramatično pospešila napredek pri študijah genov in genomov. Sledile so še številne izvedbe ter aplikacije, ki temeljijo na tej metodi (McPherson in Møller, 2006).

Pri verižni reakciji s polimerazo, ki navadno poteka v PCR tubici, so potrebni naslednji reagenti:

- matrična DNA, ki vsebuje tarčno regijo DNA, ki jo želimo namnožiti,
- začetna oligonukleotida, ki sta komplementarna na 3' konca verig tarčne regije DNA,
- *Taq* polimeraza ali druga temperaturno obstojna DNA polimeraza – v vsakem ciklu sintetizira DNA molekulo od mesta naleganja začetnih oligonukleotidov,
- dioksinukleotid tirfosfati (dNTPs) – so gradniki DNA molekule,
- reakcijski pufer – vzdržuje ustrezen pH za potek reakcije,
- divalentni kationi, običajno magnezijevi (dodajo se kot $MgCl_2$) – delujejo kot kofaktorji encimu polimerazi,
- dvakrat destilirana ali deionizirana voda – nudi reakcijsko okolje (McPherson in Møller, 2006).

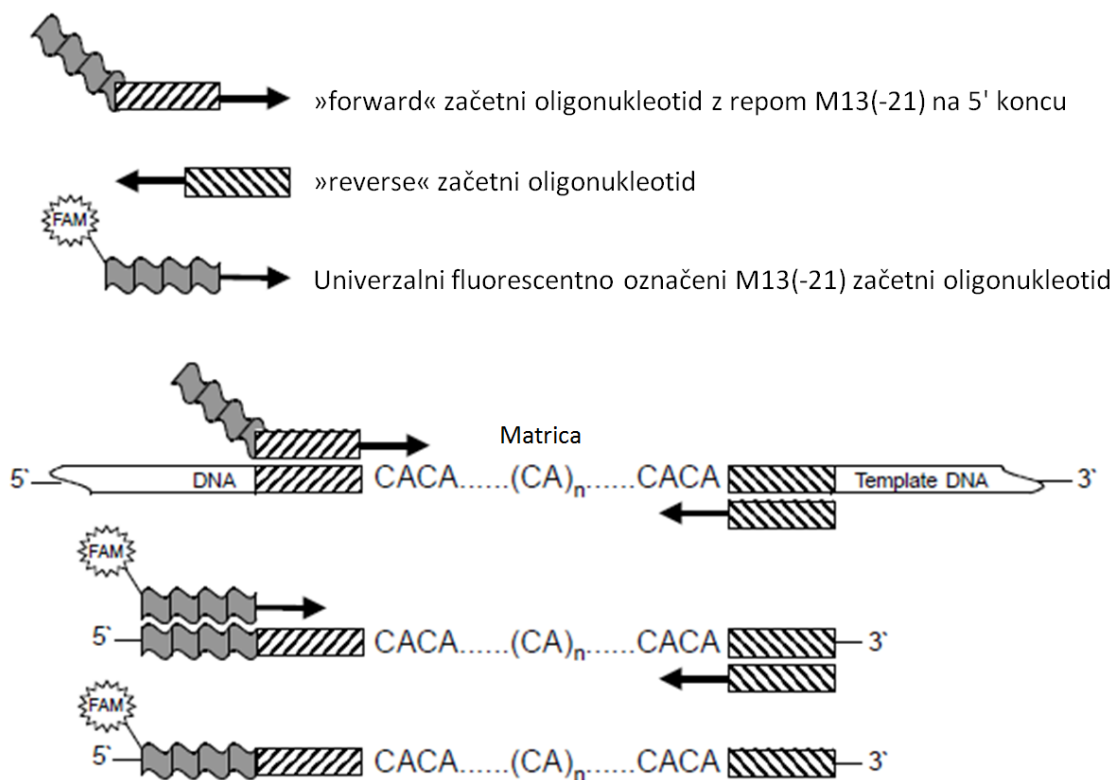
Verižno reakcijo s polimerazo v osnovi sestavljajo tri stopnje, ki se ponavljajo: denaturacija, naleganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje DNA. V prvi stopnji se uporabi visoka temperatura (običajno 94–95 °C), da pride do denaturacije (razdvojitve verig dvovijačne) DNA. Nato se pri drugi stopnji reakcije temperatura spusti, in sicer do temperature, ki je primerna za naleganje para začetnih oligonukleotidov na matrično DNA (gre za parjenje baz komplementarnih zaporedij). Izbira primerne temperature naleganja (običajno okrog 55 °C) je pomembna za zagotovitev specifičnosti reakcije (višja kot je temperatura naleganja, bolj je reakcija specifična). Za tretjo stopnjo, torej podaljševanje oziroma sintezo DNA na tarčnem mestu, ki ga določata začetna oligonukleotida, pa se temperatura dvigne in prilagodi optimumu za delovanje DNA polimeraze v reakciji (običajno na 72 °C) (McPherson in Møller, 2006).

Stopnje se pri reakciji ciklično ponavljajo, pri čemer pri vsakem naslednjem ciklu na novo sintetizirane DNA molekule nato predstavljajo matrice za pomnoževanje, zato le-to poteka eksponentno (McPherson in Møller, 2006).

2.4.1 Ekonomično fluorescentno označevanje PCR – produktov

Običajno se torej pri verižni reakciji s polimerazo uporabi dva (t. i. »forward« in »reverse«) začetna oligonukleotida. Pri tem se lahko začetne oligonukleotide označi s fluorescentnimi značkami, s pomočjo katerih se nadalje s fragmentno analizo lahko izmeri dolžina namnoženih fragmentov, kar je bistvena informacija pri genotipizaciji. Fluorescentna barvila so razmeroma draga, upoštevati je potrebno predvsem to, da določen fluorescentno označeni oligonukleotid lahko uporabimo zgolj pri namnoževanju zanj specifičnega lokusa in tako so morebitni preostanki za druge reakcije neuporabni. Zato je z motivom povečanja ekonomičnosti pri fluorescentnem označevanju PCR produktov Schuelke (2000) predlagal novo metodo z uporabo univerzalnega fluorescentno

označenega M13(-21) začetnega oligonukleotida. V tem primeru v reakciji tako nastopajo trije začetni oligonukleotidi (poleg običajnih »forward« in »reverse« še M13(-21) oligonukleotid). Pri tem ima »forward« začetni oligonukleotid na 5' koncu rep z M13(-21) zaporedjem, ki v drugem delu reakcije ob modifikaciji temperature omogoči, da vlogo »forward« začetnega oligonukleotida prevzame univerzalni fluorescentno označeni M13(-21) začetni oligonukleotid. Podrobneje na sliki 2 in v poglavju Materiali in metode. Stroški fluorescentnega označevanja se na tak način občutno zmanjšajo, saj se uporabi samo en fluorescentno označen začetni oligonukleotid za vse lokuse in celo v več različnih študijah.



Slika 2: Shematski prikaz fluorescentnega označevanja PCR produktov z uporabo univerzalnega fluorescentno označenega M13(-21) začetnega oligonukleotida (Schuelke, 2000: 233)

2.5 STATISTIČNA OBDELAVA RAZLIČNIH TIPOV PODATKOV MORFOLOŠKE KARAKTERIZACIJE

Pri morfološki karakterizaciji rastlin v skladu z deskriptorji se pridobi podatke, ki so zelo različnih tipov. Pri statistični obdelavi takih podatkov je potrebna dodatna previdnost, saj matematični tip deskriptorja determinira statistične funkcije, ki so lahko za njegovo analizo uporabljene. Torej je uporaba prave metode za določen tip podatkov bistvenega pomena za relevantnost končnih rezultatov, do katerih v nasprotnem primeru ne more priti ali pa

nimajo smisla. Pri morfološki karakterizaciji je običajno opraviti s tremi različnimi matematičnimi tipi deskriptorjev: številski tip, faktorji in urejeni faktorji. V preglednici 1 je razvidno, kako glede na matematični tip podatkov ločimo nekatere pogoste morfološke deskriptorje (Grum in Atieno, 2007).

Preglednica 1: Ločitev morfoloških deskriptorjev glede na tip podatkov s primeri in njihova definicija v programskem okolju R (Grum in Atieno, 2007: 20)

R - način	Tip deskriptorja	Primeri	
Faktor (»Factor«)	Dve stanji		
	Binarni (2 različni stanji, prisotnost, odsotnost)	Rastni tip (determinanten, nedeterminanten), stebelna fasciacija (prisotna, odsotna)	
	Več stanj		
	Kvalitativni, nominalni (ni urejenega reda)	Oblika semen (sferična, trikotna, sploščena), barva semen (siva, rjava, vijolična, rumeno-zelena)	
Urejeni faktor (»Ordered Factor«)	Ordinalni	Dlakavost (brez dlak, šibko, srednje, močno), barva cvetov (bela, bela z roza sledovi, bela z močnimi roza sledovi, roza)	
Številski (»Numeric or Integer«)	Kvantitativni	Diskretni	Kontinuirajoči
		Število semen na kapsulo, število cvetov na rastlino	Višina rastline, dolžina cveta, teža 1000 semen

Kot navajata Grum in Atieno (2007), je zaradi neupoštevanja različnih tipov podatkov v primerih analiz podatkov morfološke karakterizacije pogosta napaka, da se obravnava kvalitativne deskriptorje, kot bi bili numerični, preprosto z menjavo lastnosti (npr. barve: rdeča, modra, rumena) s številkami (1, 2, 3), kar bi v tem primeru pomenilo, da je rdeča barva bližje modri kot rumeni, kar očitno lahko izkrivi rezultate statistične analize, ki je narejena na tej osnovi. Skratka, obdelava podatkov na pravi način glede na njihov tip je pri statistični analizi podatkov morfološke karakterizacije še posebej pomembna.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

Kmetijski inštitut Slovenije (Hacquetova ulica 17, Ljubljana) je semenski material pridobil v navezi z Makedonskim kmetijskim inštitutom (blvd. Aleksandar Makedonski bb, Skopje). Le-ta pa je pri tem sodeloval še z nekaterimi drugimi ustanovami, kot so Inštitut za rastlinske genske vire »K. Malkov« iz Bolgarije, grško Nacionalno kmetijsko raziskovalno fundacijo (N. AG. RE. F.) ter Univerzo v Göttingenu. Pridobljena so bila semena sezama (*Sesamum indicum* L.) 51 različnih akcesij, ki pretežno izhajajo iz JV Evrope, nekatere preostale pa so bile uporabljene že v prejšnjih podobnih študijah in so kot take koristne pri kontroli rezultatov.

3.1.1 Setev

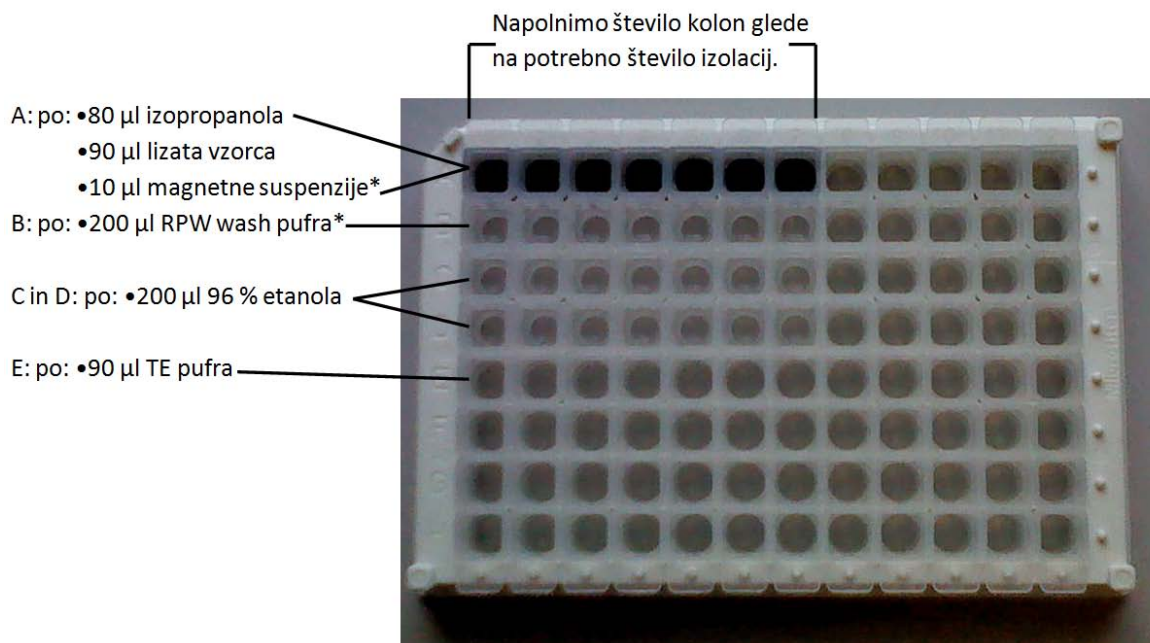
Po 40 semen na akcesijo smo posadili v vlažen kremenčev pesek. Za manjšo izgubo vlage smo pladnje z nasajenimi rastlinami pokrili s steklenimi pokrovi. Kalitev je potekala pri stalni temperaturi med 24–26 °C. Po treh dneh so rastline že kalile, po osmih pa so bile že primerne za izolacijo celokupne DNA iz listov. Med procesom smo rastline po potrebi zalili.

3.2 ANALIZA GENETSKE RAZNOLIKOSTI

Glavni del naloge je bila opredelitev genetske raznolikosti med pridobljenimi akcesijami sezama, ki je potekala na osnovi analize mikrosatelitov. Za analizo smo iz rastlin najprej izolirali celokupno DNA.

3.2.1 Priprava vzorcev in izolacija DNA

Celokupna DNA je bila izolirana z uporabo robota za izolacijo nukleinskih kislin MagMax. Uporabljen je bil program Plant_DNA ter laboratorijski komplet Quiagen Biosprint DNA Plant kit (Mediline) in pripadajoč optimiziran protokol (Pipan, 2012). Pri vsaki od 51 akcesij sezama so bili pridobljeni po 4 vzorci. Za vsak izolat je bilo zbranih 6 parov listov z rastlin starih od 8 do 11 dni. Tako je bilo za vsak izolat zbranega od 40 do 80 mg rastlinskega materiala, ki je bil v 2-ml mikrocentrifugirki homogeniziran ob dodatku 120 µl RLT lysis pufra (iz laboratorijskega kompleta) in dveh jeklenih kroglic s pomočjo mlina Retsch (TissueLyser) (nastavitve: frekvenca = 30, čas = 4 min) ter 15-minutne inkubacije na 65 °C v vodni kopeli. Sledilo je 11-minutno centrifugiranje vzorcev pri 12000 rcf in 21 °C. Zatam je bilo po 90 µl lizata vsakega vzorca prenesenega v izbrano luknjico plošče za izolacijo Magmax, v katero so bili predhodno razparcelirani potrebni reagenti za izolacijo, kot je prikazano na sliki 3.



Slika 3: Prikaz razporeditve reagentov na plošči za izolacije
Izolacija poteka robotsko s prenašanjem DNA po vrsticah z reagenti. Tisti označeni z * so del laboratorijskega kompleta Qiagen Biosprint DNA plant kit.

Izolacija z robotom MagMax poteka z uporabo mikrosferičnih magnetnih kroglic, ki na svoji površini specifično vežejo nukleinske kisline (Fang in sod., 2007). Zaradi prisotnosti ribonukleaze v laboratorijskem kompletu gre za specifično vezavo DNA molekul. Robot pri prenašanju kroglic z vezano DNA po vrsticah plošče z različnimi raztopinami (slika 3) izkorišča magnetne lastnosti kroglic. Protokol z robotom zaradi učinkovitega prenosa DNA molekul na ta način ne vsebuje stopnje centrifugiranja. Obdelava z robotom je okolju (majhna poraba reagentov) ter seveda tudi uporabniku prijazna in traja le okoli 20 min. Maksimalno število vzorcev, ki jih aparatura opravi v tem času, je 24 (2 plošči). Za vsak vzorec je bilo po končani izolaciji po 90 µl raztopine DNA v TE pufu (Priloga B) odpipetirane v označeno mesto na mikrotiterskem traku (angl. strip). Vzorci so bili do analize shranjeni v hladilniku pri 4 °C. Tako so bili torej pridobljeni 204 izolati celokupne DNA iz 1224 rastlin sezama 51 različnih akcesij.

3.2.2 Preverjanje uspešnosti izolacije DNA

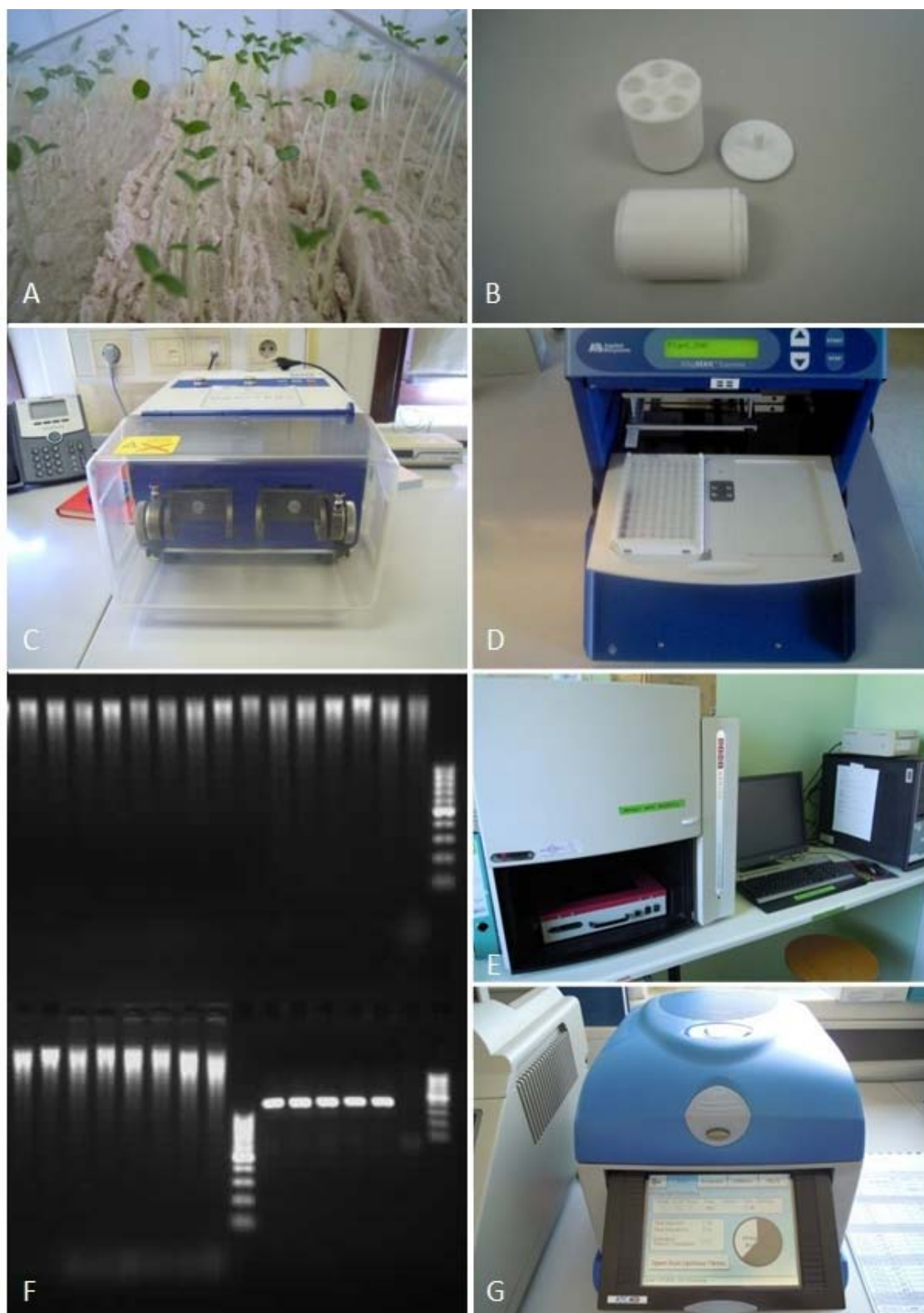
Po izolaciji je bilo potrebno njeno uspešnost preveriti. Prvi hiter test je bila preverba vzorcev z agarozno gelsko elektroforezo, kasneje smo, tudi za potrebe uravnanja koncentracije, opravili še meritve koncentracij DNA s fluorimetrom.

3.2.2.1 Agarozna gelska elektroforeza

Za preverjanje izolacije z gelsko elektroforezo smo uporabili 2 % agarozni gel (sestava: 100 ml 0,5X TBE pufer (Priloga B), 2 g agaroze, 2 μ L EtBr), v vsako luknjico pa smo nanесли 6 μ l določenega izolata pomešanega s 3 μ l nanašalnega barvila (Fermentas). Elektroforeza je potekala 30 minut pri napetosti cca. 100 V in toku 25–30 A. Za vizualizacijo rezultatov elektroforeze smo uporabili aparaturo GeneGenius (Syngene).

3.2.2.2 Merjenje koncentracije DNA in redčenje vzorcev

Koncentracijo izolirane DNA smo izmerili s fluorimetrom Amersham po navodilih proizvajalca. Za pripravo delovne raztopine smo uporabili 1X TNE pufer, ki smo ga predhodno pripravili iz 10X TNE pufra (Priloga B), tako da smo dodali potrebno količino dvakrat destilirane vode in raztopino prefiltrirali preko 0,45- μ m filtra. 1X TNE pufru smo nato dodali barvilo Hoechst 33258 (HSS) v koncentraciji 0,1 μ g/ml (iz založne raztopine s koncentracijo 1 mg/ml). Za umerjanje aparature smo uporabili raztopino DNA telečjega priželjca (100 ng/ μ l) v 1X TNE pufru. Glede na rezultate meritev smo vzorce DNA redčili z dvakrat destilirano vodo do koncentracije 20 ng/ μ l in jih shranili v novih mikrotiterskih trakovih na 4 °C v hladilniku do uporabe za PCR reakcije.



Slika 4: Izolacija DNA

A – rastlinski material, B – adapter mlina, C – mlin Retsch, D – robot za izolacijo MagMax, E – aparatura za vizualizacijo rezultatov elektroforeze GeneGenius, F – rezultati elektroforeze (zgoraj in spodaj levo: izolirana DNA, spodaj desno: PCR produkti), G – ciklični termostaat Apollo

3.2.3 PCR analiza

Pri PCR reakciji, s katero smo namnožili želene mikrosatelitne lokuse, smo uporabili pare začetnih oligonukleotidov, ki jih je objavil Pham (2011) (Podatki o le-teh so prikazani v preglednici 2), ki pa so bili zaradi drugačne metode označevanja PCR fragmentov (Schuelke, 2000) modificirani tako, da je bil vsak t. i. »forward« začetni oligonukleotid podaljšan za 18-nukleotidno zaporedje (TGT AAA ACG ACG GCC AGT), imenovano M13(-21). Tako so začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili, prikazani v preglednici 3.

Preglednica 2: Informacije o parih začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabili kot osnovo pred njihovo modifikacijo (Pham, 2011: 36)

Lokus	Zaporedji začetnih oligonukleotidov (F – »forward«, R – »reverse«)	Motiv ponovitve	Pričakovana dolžina (bp)
SSR-01	F-AGCAAGAGACAAGATGACGA R-TGGTGGATGAGCAGGTAATA	CCG	168
SSR-19	F-TCCATTGAGAACTACCAGCA R-GCCACCTGAAAATCTGAAAA	AT in ATGT	350
SSR-30	F-GATTGCAGAAATTGACACCA R-CACTAGGCGAAGAATTCAAGA	CT	239
SSR-11	F-TTCCTCTCCCTTTTCTCCTT R-CCTGCATTCCACAATTCAT	CT in ATT	500
SSR-16	F-CGAAACTCTCATCTACCCAAG R-CAGCTCGTACTTCCCATGTA	CT	386
SSR-21	F-TTCCATACCCATTTTCACCT R-GTTCGCTTTCTTGACCATTC	GTTT	393

Preglednica 3: Modificirani pari začetnih oligonukleotidov, ki smo jih poleg univerzalnega fluorescentno označenega M13(-21) začetnega oligonukleotida uporabili za namnoževanje lokusov v PCR reakcijah

Lokus	Zaporedji začetnih oligonukleotidov (F – »forward«, R – »reverse«)
SSR-01	F- TGTA AAAACGACGGCCAGTAGCAAGAGACAAGATGACGA R-TGGTGGATGAGCAGGTAATA
SSR-19	F-TGTA AAAACGACGGCCAGTTCCATTGAGAACTACCAGCA R-GCCACCTGAAAATCTGAAAA
SSR-30	F-TGTA AAAACGACGGCCAGTGATTGCAGAAATTGACACCA R-CACTAGGCGAAGAATTCAAGA
SSR-11	F-TGTA AAAACGACGGCCAGTTTCTCCTCTCCCTTTTCTCCTT R-CCTGCATTCCACAATTCAT
SSR-16	F-TGTA AAAACGACGGCCAGTCGAAACTCTCATCTACCCAAG R-CAGCTCGTACTTCCCATGTA
SSR-21	F-TGTA AAAACGACGGCCAGTTTCCATACCCATTTTCACCT R-GTTCGCTTTCTTGACCATTC

Pri PCR reakciji, ki smo jo uporabili, gre za obliko vgnezdene verižne reakcije s polimerazo, oziroma t. i. »nested PCR«, s katero se v tem primeru doseže fluorescenčno označitev produktov, kar nam služi za nadaljnjo detekcijo fragmentov oziroma analizo njihovih dolžin. V vsaki reakciji so bili prisotni trije različni začetni oligonukleotidi, in sicer:

- »forward« začetni oligonukletid, ki je sestavljen iz dela za specifično naleganje na izbran odsek genomske DNA sezama in iz repa M13(-21) na 5' koncu,
- »reverse« začetni oligonukleotid,
- univerzalni fluorescentno označeni M13(-21) začetni oligonukleotid.

Pogoji take reakcije so zasnovani tako, da se v prvih ciklih v nastajajoč produkt vgrajuje »forward« začetni oligonukleotid z M13(-21) repom. Ko se le-ta porabi oziroma vgradi, se v kasnejših ciklih temperatura naleganja prilagodi/spusti, da univerzalni fluorescentno označeni M13(-21) začetni oligonukleotid prevzame funkcijo »forward« primerja in posledično pride do nastajanja fluorescentno označenega produkta reakcije (Schuelke, 2000).

Uporabljali smo tri različne fluorescenčne značke (FAM, NED, HEX) za različne mikrosatelite, kar je povečalo učinkovitost postopke detekcije.

Mešanice za vsako verižno reakcijo s polimerazo so vsebovale po: 1 µl 10 X PCR pufru – brez $MgCl_2$ (Biotools); 0,2 µl (800 µM koncentracija v mešanici) dioksinukleotid trifosfatov; 0,1 µl (0,1 µM) »forward« začetnega oligonukleotida; 0,25 µl (0,25 µM) »reverse« začetnega oligonukleotida; 0,183 (4,575 µM) univerzalnega fluorescentno označenega M13(-21) začetnega oligonukleotida; 0,5 µl (2,5 mM) $MgCl_2$ (Biotools); 7,77 µl vode (deionizirana, »nuclease free«, Promega) in 0,05 µl (0,25 U) DNA polimeraze (5 U/µl, Biotools). Tako pripravljeni reakcijski mešanici z volumnom 10 µl smo nato dodali še 30 ng (1,5 µl raztopine) genomske DNA, tako da je vsaka reakcija potekala v volumnu 11,5 µl.

Verižne reakcije s polimerazo so potekale v cikličnem termostatu Apollo ATC 401 (Apollo Instrumentation). Temperaturne nastavitve so bile prilagojene prej omenjenemu načinu označevanja produkta. Po predhodnih preizkusih in optimizaciji smo za namnoževanje uporabili protokola: A (za pare začetnih oligonukleotidov: 19, 21, 30) in B (za pare začetnih oligonukleotidov: 1, 11, 16), ki sta t. i. »touch-down« protokola pomnoževanja, kar pomeni, da se v fazi naleganja začetnih oligonukleotidov temperaturo v vsakem ciklu zniža za določeno vrednost, v našem primeru za 0,7 °C.

Temperaturne nastavitve uporabljenih programov:

Protokol A

4 minute pri 94 °C,
sledi 15 ciklov: 1 minuta pri 94 °C, 30 sekund pri 60 °C (pri vsakem naslednjem od 15 ciklov se temperatura zmanjša za 0,7 °C), 1 minuta pri 72 °C,
nato sledi 23 ciklov: 30 sekund pri 94 °C, 30 sekund pri 53 °C, 1 minuta pri 72 °C
ter še končno podaljševanje: 5 minut pri 72 °C.

Protokol B

4 minute pri 94 °C,
sledi 15 ciklov: 1 minuta pri 94 °C, 30 sekund pri 59 °C (pri vsakem naslednjem od 15 ciklov se temperatura zmanjša za 0,7 °C), 1 minuta pri 72 °C,
nato sledi 23 ciklov: 30 sekund pri 94 °C, 30 sekund pri 52 °C, 1 minuta pri 72 °C
ter še končno podaljševanje: 5 minut pri 72 °C.

3.2.4 Preverjanje uspešnosti PCR analize

Uspešnost verižne reakcije s polimerazo smo najprej preverili z agarozno gelsko elektroforezo, zato da smo lahko pred nadaljnjo analizo morebitne neuspele reakcije ponovili. Agarozna gelska elektroforeza je torej imela le funkcijo testa za preverbo, glavni postopek v nadaljevanju pa je bila fragmentna analiza.

Za preverjanje uspešnosti reakcij namnoževanja z agarozno gelsko elektroforezo smo uporabili 1,4 % agarozni gel (sestava: 180 ml 0,5 X TBE pufer (Priloga B), 2,52 g agaroze, 3,6 µL EtBr), v vsako luknjico pa smo nanесли 4 µl določenega vzorca pomešanega s 3 µl nanašalnega barvila (Fermentas). Elektroforeza je potekala 45 minut pri napetosti cca. 100 V in toku 25–30 A. Za vizualizacijo rezultatov elektroforeze smo zopet uporabili aparaturo GeneGenius.

3.2.5 Priprava vzorcev za fragmentno analizo

Za fragmentno analizo smo na 96-mestne plošče (Sarstedt) nanесли po 7,4 µl mešanice formamida (7 µl) in dolžinskega standarda ROX 500 (0,4 µl) na luknjico plošče. Formamid je močan denaturant, ki pri molekuli DNA ruši strukturo dvojne vijačnice. Mešanico smo pripravili predhodno glede na količinske potrebe ter jo nato razporedili po plošči s pipeto. Nato smo na ploščo dodali še namnožene fragmente, ki so nastali z verižno reakcijo s polimerazo. Ker so bili vzorci različno fluorescentno označeni (z barvili FAM, NED in HEX), smo jih za fragmentno analizo združevali po 3 skupaj. Torej smo v vsako luknjico na plošči dodali 3-krat po 1,5 µl namnoženih fragmentov. Plošče smo potem pokrili s pripadajočimi pokrovi (Applied Biosystems) ter jih na kratko centrifugirali.

Toplotna denaturacija je potekala 2 minuti na 95 °C, izvedli pa smo jo v cikličnem termostatu GeneAmp 9700 (Applied Biosystems). Po denaturaciji smo plošče takoj postavili na led, zatem pa so bile prepeljane na Oddelek za zootehniko Biotehniške fakultete (Groblje 3, Domžale), kjer je potekala fragmentna analiza.

3.2.6 Fragmentna analiza

Na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete so fragmentno analizo opravili z genetskim analizatorjem ABI 3130 XL (Applied Biosystems), katerega delovanje temelji na principu kapilarne elektroforeze. Analiza fragmentov poteka preko detekcije fluorescence barvil na fragmentih, ki se jo vzbudi z laserskim obsevanjem. Upravljalcu aparature smo pred analizo poslali potrebne podatke o vzorcih, po analizi pa smo rezultate oziroma podatke o elektroferogramih dobili v obliki FSA datotek, ki smo jih nato obdelali z računalniškim programom GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems).

3.2.7 Obdelava rezultatov fragmentne analize

Rezultate fragmentne analize smo obdelali s programom GeneMapper 4.0. Iz uvoženih podatkov o elektroferogramih posameznih vzorcev smo z upoštevanjem uporabljenega dolžinskega standarda (ROX 500) ter z ozirom na lastnosti posameznega mikrosatelita (glede na dolžino posamezne enote ponovitve) in intenziteto fluorescentnega signala odstranili šume. Pridobili smo podatke o prisotnosti in dolžini alelov, ki smo jih nadalje izvozili in shranili v obliki Excelovih datotek.

3.2.8 Obdelava podatkov o mikrosatelitih s statističnimi programi

Sledila je obdelava mikrosatelitnih podatkov z različnimi statističnimi programi, s katerimi smo med drugim izračunali sledeče parametre variabilnosti, ki so bistveni za vrednotenje mikrosatelitnih markerjev:

- dejanska heterozigotnost (H_o) – predstavlja delež heterozigotnih posameznikov v analiziranem vzorcu,
- pričakovana heterozigotnost (H_e) – ali genetska raznolikost, predstavlja delež populacije, ki bi bila heterozigotna v primeru, da bi med posamezniki prišlo do naključnega križanja, hkrati pa predstavlja zmožnost markerja za ločevanje med genotipi,
- informacijska vrednost polimorfizma (PIC – angl. polymorphic information content) – predstavlja informativnost posameznega markerja oziroma stopnjo, pri kateri z markerjem nedvoumno določimo genetsko identiteto posameznika in vključuje tako število alelov, odkritih na posameznem lokusu, kot tudi frekvence posameznih alelov,

- verjetnost enakosti genotipov (PI – angl. probability of identity) – predstavlja verjetnost, da imata katerakoli dva naključno izbrana posameznika dva enaka alela na proučevanem lokusu. Višja vrednost PI tako kaže na nizko informativnost, kar je ponavadi posledica majhnega števila alelov, ali pa visoke frekvence enega izmed alelov (Štajner, 2010).

3.2.8.1 Excel Microsatellite Toolkit

Pridobljene podatke o mikrosatelitih smo najprej analizirali s programom Excel Microsatellite Toolkit verzije 3.1.1, ki je dodatek za program Microsoft Excel in vsebuje orodja za populacijsko genetiko v povezavi z mikrosateliti.

Z Microsatellite Toolkitom smo detektirali morebitno nepravilno zapisane podatke ter opravili več izračunov parametrov: frekvence alelov, dejanska in pričakovana heterozigotnost, informacijske vrednosti polimorfizma – PIC, ter pripravili vstopne oblike podatkov za obdelavo z nekaterimi drugimi programi za analize mikrosatelitov: Fstat, Populations.

3.2.8.2 FSTAT

FSTAT je računalniški program za oceno in testiranje genetske diverzitete in izračune statistike za kodominantne genetske markerje (FSTAT, 2005). Poleg izračuna nekaterih bolj osnovnih parametrov, ki jih med drugim poda že program Microsatellite Toolkit, smo s FSTATom pridobili tudi podatke o številu alelov, ki se v povprečju pojavljajo skozi populacijo (angl. allelic richness).

3.2.8.3 Populations

Populations 1.2.30 je uporaben program za genetske analize na področju populacijske genetike in kot tak nudi opcijo preračuna podatkov za izdelavo filogenetskih dreves, ki jih nato lahko vizualiziramo s programom TreeView.

Z Microsatellite Toolkitom smo v programu Microsoft Excel obdelali podatke o prisotnosti in dolžini alelov, in sicer na dva načina: pri **globalni obdelavi** program ne upošteva nikakršnih populacij in rezultati v tem primeru prikazujejo statistiko za posamezne lokuse, pri **populacijski obdelavi** pa smo sprva kot posamezne populacije obravnavali posamezne sezamove akcesije, nato pa smo populacije razširili tako, da je posamezna populacija predstavljala akcesije s skupno državo izvora. Priprava rezultatov v formatu GenePop je bila eden od rezultatov populacijske obdelave. Podatki v formatu GenePop so primerni za obdelavo s programom Populations. Z njim smo izračunali populacijske razdalje z uporabo Neijeve standardne genetske razdalje – Ds (Nei, 1972) in pripravili podatke za izris

filogenetskega drevesa z uporabo metode UPGMA (angl. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) (Sneath in Sokal, 1973), ki smo jih shranili v PHYLIP formatu.

3.2.8.4 TreeView

TreeView je preprost program za grafični prikaz filogenetskih povezav oziroma za izris filogenetskih dreves.

Podatke v PHYLIP formatu, ki so bili rezultat obdelave s Populations, smo uvozili v program TreeView. Pri izrisu našega drevesa smo izbrali obliko radialnega drevesa, ker ocenjujemo, da je v tem načinu najboljše razvidna filogenetska razporeditev/oddaljenost med posameznimi akcesijami oziroma skupinami akcesij.

3.2.8.5 IDENTITY

IDENTITY 1.0 je program za analizo podatkov o mikrosatelitih, ki je bil razvit za potrebe študij vinske trte (Wagner in Sefc, 1999). S programom IDENTITY smo pridobili ocene frekvenc ničtih alelov.

Z omenjenimi programi smo prišli do rezultatov analize genetske raznolikosti in s tem zaključili prvi del naloge.

3.3 ANALIZA MORFOLOŠKE RAZNOLIKOSTI

Drugi obsežen sklop magistrske naloge pa je bila analiza morfološke raznolikosti med 51 akcesijami sezama, s čimer je odprta možnost asociacijskemu primerjanju oziroma iskanju povezav med podatki o genetski raznolikosti s podatki o morfološkem ovrednotenju.

3.3.1 Presajanje

Za namen analize morfološke raznolikosti smo morali vzgojiti odrasle rastline sezama, zato smo 9 dni stare rastline (po 7 na posamezno akcesijo) presadili v lonce s substratom. Substrat, ki smo ga predhodno pripravili, so sestavljale naslednje komponente: humusni substrat (40 %), zemlja (30 %), mivka (20 %) in perlit (10 %).

Po presajanju smo rastline prestavili v rastlinjak v Infrastrukturni center Jablje (Grajska cesta 1, Mengeš (enota Kmetijskega inštituta Slovenije)), kjer so ostale do žetve. Zalivanje je potekalo z avtomatskim namakalnim sistemom, katerega smo nastavili tako, da se je vklapljal dvakrat tedensko po 10 minut.

3.3.2 Zdravstveno stanje rastlin

Ker smo tekom poskusa imeli manjši napad gosenic, smo rastline enkrat tretirali z insekticidom Calypso SC 480. Nadaljnjih težav z gosenicami ni bilo več. Poleg tega smo pri zelo redkih listih opazili tudi manjše ožige, ki so verjetno nastali zaradi rose. Sicer ocenjujemo, da so bile vzgojene rastline v dobri kondiciji.

3.3.3 Ocenjevanje

Ocenjevanje je potekalo tekom rasti in ob žetvi. Rastline smo ocenjevali po navodilih mednarodnih (Bioversity International) deskriptorjev (Descriptors ..., 2004). Vsako akcesijo smo ocenili po 46 različnih deskriptorjih ter podatke v programu Microsoft Excel pripravili v obliki tabel za nadaljnjo analizo.

3.3.4 Obdelava podatkov

Pri obdelavi kompleksnih podatkov (več različnih podatkovnih tipov) morfološke karakterizacije smo se poslužili priročnika *Statistical Analysis for Plant Genetic Resources: Clustering and indices in R made simple* (Grum in Atieno, 2007), ki ga je prav za ta namen izdala organizacija Bioversity International. Analizo podatkov smo tako opravili s programskim jezikom v programskem okolju R.

Pri tem smo uporabili paketa »gclus« in »vegan«, ki smo jih naložili s spleta. Naše podatke pa smo uvozili v obliki tekstovne »tab-delimited« datoteke. Ker so podatki morfološkega vrednotenja zelo različnih tipov (npr. podatki o: tipu rasti, višini rastline, dlakavosti stebela, barvi listov ...) je najpomembnejša stopnja pri obdelavi teh podatkov določitev tipa podatkov, da jih program pravilno procesira in upošteva. Glede na tip so podatki lahko numerični, faktorji ali urejeni faktorji. R avtomatično zazna alfanumerične spremenljivke (spremenljivke s črkami, ali s črkami in številkami) kot faktorje ter numerične spremenljivke kot numerični tip podatkov. V primerih, ko so bile faktorske spremenljivke zapisane s števili, R tega ne zazna, prav tako ne more zaznati, kdaj je faktor urejen in kakšen je določen red. V teh primerih smo z ukazi določili tip podatkov in glede na le-tega zagotovili pravilno obravnavo. Z uporabo UPGMA metode smo tako akcesije sezama glede na podatke morfološke karakterizacije lahko razporedili v drevo.

Poleg tega smo nekatere osnovne statistične izračune – za numerične spremenljivke tudi analize variance (ANOVA) – ter tabelarične preglede podatkov opravili s pomočjo programa Microsoft Excel.



Slika 5: Vzgoja rastlin za morfološko karakterizacijo

A – kaljenje in zgodnja rast v pladnjih s kremenčevim peskom, B – rast v plastenjaku po presaditvi, vzpostavljen je namakalni sistem, C – rastline, primerne za ocenjevanje

3.4 ANALIZA KORELACIJ GENETIKA – MORFOLOGIJA

Genetsko in morfološko matriko smo med sabo primerjali z Mantelovim testom (Mantel, 1967) v računalniškem programu GenALEX 6.4.1 (Peakall in Smouse, 2006).

Vsaka akcesija je bila v Mantelovem testu tako pri genetski kot pri morfološki vhodni matriki vključena kot en genotip. Zaradi združljivosti šifriranja v morfološko matriko nismo vključili opisnih spremenljivk in spremenljivk, ki vključujejo decimalna števila.

Mantelov korelacijski koeficient (r_{xy}) predstavlja merilo skladnosti, s pomočjo katerega smo ovrednotili povezanost akcesij na genetskem in morfološkem nivoju. V primeru, da je korelacijski koeficient negativen ($-1 \leq r_{xy} \leq 0$), govorimo o slabih genetskih in morfoloških povezavah; pozitiven korelacijski koeficient ($0 < r_{xy} \leq 1$) pa nakazuje, da genetska in morfološka povezanost med analiziranimi akcesijami obstaja. Matrika morfološkega vrednotenja je vključevala 22 morfoloških znakov, genetska matrika pa 8 mikrosatelitnih lokusov znotraj 51-ih akcesij.

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 REZULTATI GENETSKE ANALIZE

4.1.1 Obravnava po lokusih

Podatke genetske karakterizacije smo najprej obravnavali po lokusih. Preglednica 4 tako prikazuje dolžine vseh alelov za vse lokuse in pripadajoče frekvence pojavljanja alelov globalno med vsemi analiziranimi vzorci. Preglednica 5 pa ponuja prav tako globalni pregled parametrov variabilnosti po posameznih lokusih. Ti parametri so število alelov, dejanska heterozigotnost (H_o), pričakovana heterozigotnost (H_e), informacijska vrednost polimorfizma (PIC), verjetnost enakosti genotipov (PI) in ocena frekvence ničtih alelov (OF_0).

Preglednica 4: Dolžine alelov in njihove frekvence za posamezne lokuse

Lokus	Dolžine (bp) in frekvence alelov (%)							
SSR-01	171	183	189					
Frekvence alelov	37,76	61,22	1,02					
SSR-19	296	298	344	346	362	368	370	
Frekvence alelov	31,25	1,30	0,52	3,65	1,04	42,71	19,53	
SSR-30	235	237	253	255				
Frekvence alelov	35,86	5,30	53,03	5,81				
SSR-11	478	480	492	519				
Frekvence alelov	2,73	1,37	0,55	95,36				
SSR-16	374	376	378	380	382	384	398	400
Frekvence alelov	5,18	2,59	10,88	5,70	2,33	1,04	66,84	5,44
SSR-21	374	382	402	410				
Frekvence alelov	20,81	20,81	25,89	32,49				

Preglednica 5: Parametri variabilnosti po posameznih lokusih

Lokus	Št. alelov	H_o	H_e	PIC	PI	OF_0
SSR-01	3	0,765	0,483	0,376	0,375	-0,191
SSR-19	7	0,823	0,680	0,622	0,160	-0,085
SSR-30	4	0,823	0,584	0,507	0,250	-0,151
SSR-11	4	0,093	0,090	0,088	0,830	-0,003
SSR-16	8	0,544	0,531	0,511	0,240	-0,008
SSR-21	4	0,863	0,741	0,693	0,115	-0,070
Skupno	30				$3,45 \times 10^{-4}$	
Povprečje	5	0,652	0,518	0,466		-0,085

4.1.1.1 Lokus SSR-01

Za lokus SSR-01 je značilen trinukleotidni osnovni motiv mikrosatelitne ponovitve CCG (Pham, 2011). Pri tem lokusu smo določili tri alelne dolžine med 171 in 189 bp, pri čemer alela 171 in 183 skupaj pokrijeta več kot 98 % frekvence alelov, medtem ko se alel 189 pojavi samo pri dveh etiopskih akcesijah (ET4 in ET10). Pričakovana heterozigotnost na tem lokusu je 0,483, dejanska pa 0,765.

4.1.1.2 Lokus SSR-19

Pri lokusu SSR-19 imamo opravka s sestavljenim mikrosatelitom, katerega osnovna motiva ponovitve sta AT in ATGT (Pham, 2011). Pri tem lokusu smo določili sedem alelnih dolžin med 296 in 370 bp. Velik razpon alelnih dolžin bi verjetno lahko pripisali dejstvu, da gre za sestavljen mikrosatelitni lokus. Alel 368 je prisoten s frekvenco 42,71 % in v tem primeru najbolj zastopan. Alel 362 pa je specifično značilen le za akcesijo iz Sudana (SD). Pričakovana heterozigotnost na tem lokusu je 0,680, dejanska pa 0,823.

4.1.1.3 Lokus SSR-30

Za lokus SSR-01 je značilen dinukleotidni osnovni motiv mikrosatelitne ponovitve CT (Pham, 2011). Pri tem lokusu smo določili štiri alele z razponom dolžine med 235 in 255 bp, pri čemer več kot polovico alelov predstavlja alel 253 (alelna frekvenca = 53,03 %). Pričakovana heterozigotnost na tem lokusu je 0,584, dejanska pa 0,823.

4.1.1.4 Lokus SSR-11

Tudi pri lokusu SSR-11 gre za sestavljen mikrosatelit z osnovnima motivoma ponovitve CT in ATT (Pham, 2011). Pri tem lokusu smo določili štiri alele z razponom dolžine med 478 in 519 bp. Največjo alelno frekvenco, kar 95,5 % (kar je med drugim tudi največ izmed vseh alelnih frekvenc v naši raziskavi), ima alel 519. Kljub nizkim frekvencam ostali aleli na tem lokusu v nobenem primeru niso specifični za določeno akcesijo. Pričakovana heterozigotnost na tem lokusu je 0,090, dejanska pa 0,093.

4.1.1.5 Lokus SSR-16

Lokua SSR-16 ima dinukleotidni osnovni motiv mikrosatelitne ponovitve CT (Pham, 2011). Tu smo določili osem alelnih dolžin z razponom med 374 in 400 bp, pri čemer ima največjo alelno frekvenco alel 398, ki je zastopan v 66,84 % primerov. Tudi v tem primeru nismo našli specifičnih alelov za katero izmed akcesij. Pričakovana heterozigotnost na tem lokusu je 0,531, dejanska pa 0,544.

4.1.1.6 Lokus SSR-21

Za lokus SSR-21 je značilen tetranukleotidni osnovni motiv mikrosatelitne ponovitve GTTT (Pham, 2011). Pri tem lokusu smo določili štiri alelne dolžine z razponom med 374 in 410, pri čemer pa po frekvenci alelov navzgor ali navzdol bistveno ne izstopa nobena (alelne frekvence so v rangi med 20 in 33 %). Pričakovana heterozigotnost na tem lokusu je 0,741, dejanska pa 0,863. Lokus ima najvišjo PIC vrednost (0,693), kar pomeni, da je izmed vseh najbolj informativen in ima najnižjo PI vrednost (0,115), torej se 2 enaka genotipa na tem lokusu pojavita na vsakih 8,7.

V splošnem lahko rečemo, da sta pri večini lokusov pričakovana heterozigotnost, kot tudi PIC vrednost primerno visoki, torej da so lokusi solidno ali vsaj srednje informativni, negativno pa izstopa lokus SSR-11, ki je zelo slabo informativen, na kar kažejo pripadajoče nizke vrednosti H_e (0,090), PIC (0,088) in visoka vrednost PI (0,830). Omenjen lokus s tem tudi najbolj niža povprečni vrednosti za H_e in PIC, ki sta tako 0,518 in 0,466. Skupna vrednost PI je $3,45 \times 10^{-4}$, kar bi hipotetično pomenilo 2 enaka genotipa na vseh lokusih v populaciji izmed slabih tri tisoč. Razmisliti velja o ocenah frekvenc ničtih alelov, ki so za vse lokuse negativne, kljub temu pa so se v študiji ničti aleli pojavljali. Negativnost ocen frekvenc ničtih alelov sicer izhaja iz formule za izračun ocen, tako da so le-te negativne v vseh primerih, ko je H_e manjša od H_o .

4.1.2 Parne primerjave genotipov

S programom Microsatellite Toolkit smo naredili parne primerjave vseh genotipov. Program je opravil 19223 primerjav. Povzetki primerjav so prikazani v preglednici 6 in na sliki 6. Pri branju podatkov je potrebno upoštevati, da so se identični genotipi pogosto pojavljali znotraj posameznih akcesij. Največji delež primerjav (20,31 %) predstavljajo pari pri katerih je šlo za ujemanje v 7 od 12 alelov, najmanjše deleže pa imajo skupine parov primerjav s popolnim ujemanjem (1,29 %), z ujemanjem samo v enem alelu (0,30 %), in brez ujemanja (0,04 %).



Slika 6: Porazdelitev parnih primerjav genotipov glede na število ujemaajočih se alelov

Porazdelitev primerjav glede na ujemanje jasno prikazuje stolpčni diagram na sliki 6. Glede na lastnosti lokusa SSR-11, ki je globalno zelo uniformen (frekvenca najbolj zastopanega alela na tem lokusu je 95,36 %), je zelo nizko število parov genotipov s popolnim neujemanjem pričakovano.

Preglednica 6: Globalni pregled ujemanj genotipov

Število ujemaajočih se alelov	Število parov genotipov	Delež vseh primerjav (%)
12	248	1,29
11	978	5,09
10	1417	7,37
9	2705	14,07
8	3382	17,59
7	3904	20,31
6	2929	15,24
5	1292	6,72
4	1367	7,11
3	523	2,72
2	413	2,15
1	58	0,30
0	7	0,04
Vseh primerjav	19223	100,00

4.1.3 Obravnava po populacijah

Po opravljenem globalnem pregledu podatkov genetske karakterizacije smo podatke poskušali opredeliti tudi na populacijski ravni oziroma glede na pripadnost akcesijam. Pri obdelavi podatkov smo namreč vsako akcesijo ločeno obravnavali kot svojo populacijo. Seznam vseh akcesij s podatki o njihovem poreklu in kratičnih oznakah, uporabljenih v nalogi, je v prilogi A.

S pregledom zgoraj omenjenih podatkov, pridobljenih s programom Microsatellite Toolkit o ujemanju genotipov, smo pridobili informacije za preglednico 7, ki prikazuje populacije/akcesije, ki jih povezuje vsaj en identičen genotip. Identični genotipi so se pojavljali večinoma znotraj akcesij, v primerih navedenih v naslednji preglednici pa med različnimi akcesijami. Ker so populacije navedene v skupinah, ki jih povezuje enak genotip, se nekatere, kot je MK5, v preglednici pojavijo večkrat kot del različnih skupin.

Preglednica 7: Skupine populacij/akcesij, v katerih se pojavljajo enaki genotipi

Št. populacij (akcesij) v skupini	Populacije (akcesije), ki jih povezuje vsaj en identičen genotip
7	MK1, MK2, MK3, MK4, MK5, MK6, MK7
7	ET5, ET6, ET7, ET10, ET16, BG4, BG6
6	BG4, BG6, ET10, ET13, ET14, NN
5	MK11, MK12, MK13, TR2, TR3
3	MK5, MK9, MK12
3	MK1, MK2, MK6
3	MK1, MK3, MK6
3	MK5, MK7, MK13
3	MK5, ET7, ET14
3	BG4, ET13, ET14
3	ET7, ET15, BG5
3	ET7, ET15, NN
3	KR, RU3, JP
2	MK6, MK8
2	TR1, TR2
2	BG3, TR
2	ET15, BG5
2	ET3, ET8
2	ET8, ET12

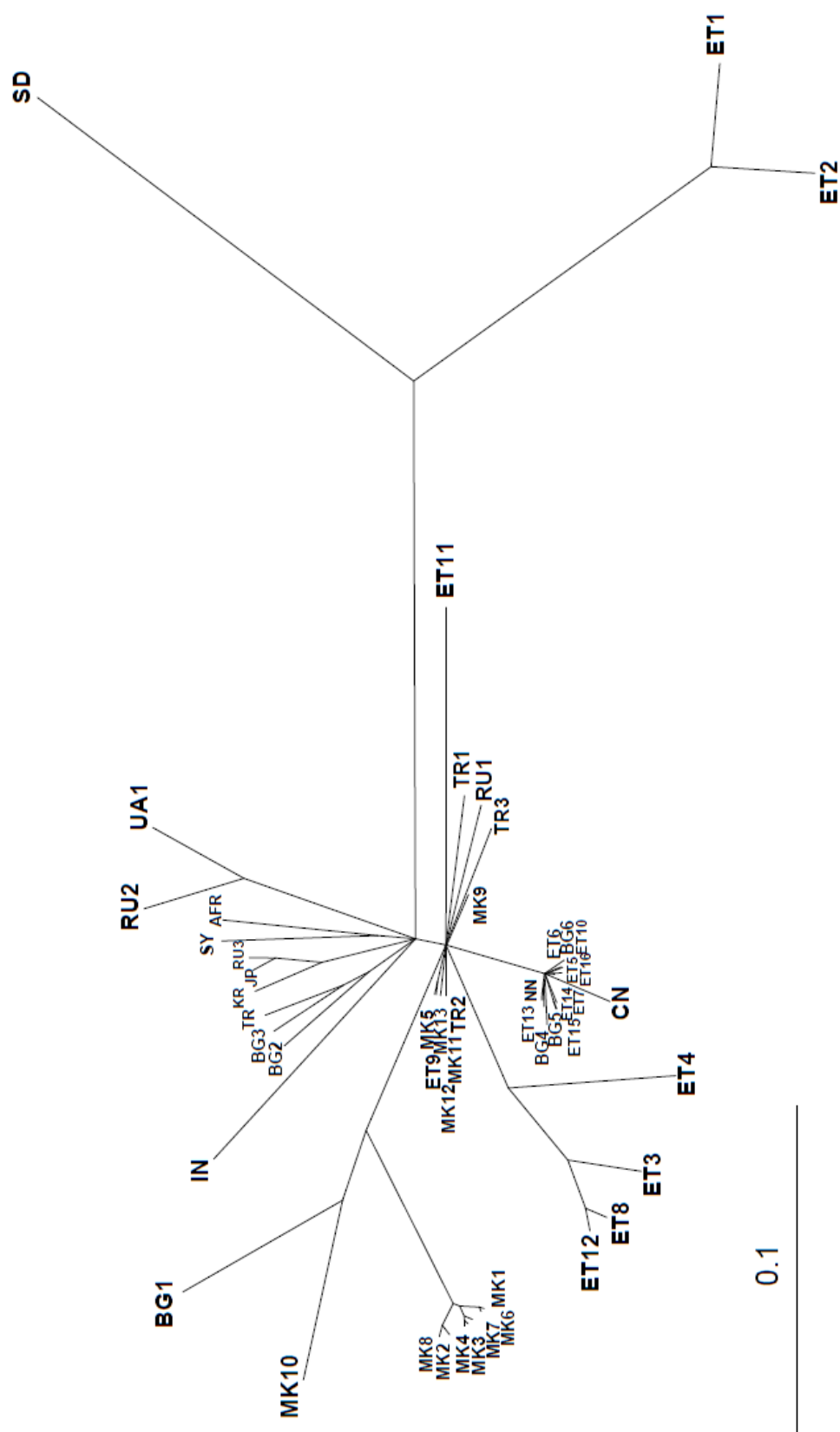
Našli smo 19 omenjenih skupin. Največji izmed njih imata po 7 akcesij. Največ (9) pa je skupin s po tremi akcesijami. Za dovršen del skupin velja, da jih sestavljajo akcesije s skupno državo izvora.

V preglednici 8 smo pripravili pregled dejanske heterozigotnosti in povprečnega števila alelov na lokus za vse analizirane evropske akcesije (preglednica z vsemi analiziranimi akcesijami je v prilogi C). Glede na to, da je skupno število različnih alelov na vseh lokusih, ki so se v naši raziskavi pojavljali 30 in da je bilo preučevanih lokusov 6, je maksimalno možno število alelov na lokus 5. V preglednici 8 pa zasledimo vrednosti z razponom od 1,33 do 2,5, se pravi do polovice maksimalne vrednosti. Populacijske vrednosti za dejansko heterozigotnost pa variirajo med 0,250 in 0,958. Gre za precej velik razpon, rahlo presenetljive so tudi nekatere visoke vrednosti za dejansko heterozigotnost, saj je sezam samoprašna rastlina, kar spodbuja nastanek homozigotih rastlin, res pa je, da več virov različnim sortam sezama pripisuje različno stopnjo tujeprašnosti (Khidir, 1972; Bedigan in sod., 1986; Ashri, 1998).

Preglednica 8: Dejanska heterozigotnost in povprečno število alelov/lokus znotraj populacij (akcesij)

Populacija (akcesija)	Ho	Povprečno število alelov/lokus
MK3	0,292	1,33
MK1	0,250	1,50
MK2	0,417	1,50
MK4	0,333	1,50
MK6	0,292	1,67
MK7	0,375	1,67
MK8	0,417	1,67
BG3	0,458	1,67
MK5	0,639	1,83
MK10	0,569	1,83
MK13	0,625	1,83
RU2	0,833	1,83
BG1	0,417	2,00
BG6	0,750	2,00
RU3	0,708	2,00
MK9	0,750	2,17
MK11	0,917	2,17
BG2	0,583	2,17
BG4	0,750	2,17
BG5	0,792	2,17
RU1	0,597	2,17
TR	0,736	2,17
UA1	0,653	2,17
MK12	0,875	2,33
TR1	0,958	2,33
TR2	0,875	2,33
TR3	0,708	2,50
Povprečje	0,614	1,95

Ob koncu obdelave podatkov genetske analize smo v programu Treeview z izračuni, pridobljenimi s pomočjo programov Microsatellite Toolkit ter Populations, izrisali drevo standardnih genetskih razdalj med populacijami (slika 7). Pri radialni obliki drevesa je dobro razvidna grupiranost populacij.



Slika 7: Drevo standardnih genetskih razdalj med populacijami

Opazimo, da se pretežen del makedonskih akcesij nahaja v dveh skupinah. Prvo sestavljajo populacije MK1, MK2, MK3, MK4, MK6, MK7, MK8, drugo pa MK5, MK11, MK12, MK13.

Tudi večji del bolgarskih akcesij se je razporedil v dve različni skupini. Prvi s populacijami BG2 in BG3 je očitno najbližje akcesija TR, ki izhaja iz Turčije, v drugi, ki jo med drugim zastopajo populacije BG4, BG5 in BG6, pa so presenetljivo genetsko bližje etiopske akcesije.

Akcesije iz JV Evrope se tako grupirajo v 4 večje skupine, ki v celotno sliko prinašajo svoj genski nabor.

Ruske akcesije se v drevesu nahajajo ločeno. RU1 je v skupini s še dvema turškima populacijama TR1 in TR3, populaciji RU2 je najbližje ukrajinska populacija UA1, populacija RU3 pa je v skupinici z akcesijami iz Japonske in Južne Koreje.

Zanimivo je, da so nekatere akcesije, ki izhajajo iz oddaljenih geografskih območij, genetsko blizu evropskim akcesijam, pričakovali bi namreč več primerov, pri katerih se bi geografska oddaljenost kazala tudi na genetskem nivoju, kot npr. primer populacij SD (izhaja iz Sudana) ter ET1 in ET2 (izhajata iz Etiopije), ki kažejo sorazmerno veliko genetsko oddaljenost od evropskih populacij.

Dilemo o dveh gencentrih sezama (Afrika, Indija) bi z našim drevesom težko razjasnili, vendar pa lahko rečemo, da se afriške akcesije v splošnem na drevesu (slika 7) nahajajo zgoraj (SD, ET1 in ET2) in desno (preostale etiopske akcesije), azijske akcesije pa pretežno levo (RU2, RU3, IN, JP).

Več JV-evropskih akcesij je na spodnji strani drevesa (BG1, MK1, MK2, MK3, MK4, MK6, MK7, MK8, MK10), preostale skupine akcesij iz JV Evrope pa so razporejene med azijske in na afriške.

Lahko rečemo, da naše drevo genetskih razdaj do določene mere odraža tudi geografsko poreklo akcesij in oddaljenost med njimi, vendar pa se kažejo odstopanja (npr. kitajska akcesija CN na desni »afriški« strani drevesa, majhna oddaljenost nekaterih etiopskih in JV-evropskih akcesij). Predhodne študije kažejo različne rezultate. Ercan in sod. (2004) pri RAPD analizi turškega sezama in Tabatabaei in sod. (2011) pri proučevanju iranskega sezama ter Ali in sod. (2007) pri AFLP analizi sezamovih akcesij z različnih delov sveta so ugotovili, da med podatki genetske karakterizacije in geografskim poreklom akcesij v večini primerov obstaja povezava. V nasprotju z njimi Laurentin in Karlovsky (2006) pri analizi indijskih, afriških, kitajskih, korejskih in japonskih akcesij sezama z AFLP markerji nista našla posebne povezave med geografskim poreklom akcesij in njihovimi AFLP vzorci.

Do tu smo pri populacijski obravnavi vsako akcesijo ločeno obravnavali kot svojo populacijo. Za preglednico 9 pa smo kot populacije obravnavali skupine akcesij z enakimi

državami izvora. Za tako izbrane populacije smo izračunali povprečne vrednosti H_e , H_o , PIC vrednosti in povprečno število alelov na lokus. Populacije so v preglednici navedene po naraščajoči vrednosti H_e .

Preglednica 9: Podatki genetske karakterizacije, prikazani po populacijah

Populacija akcesij	Število genotipov	H_e	PIC	H_o	Povprečno število alelov/lokus
IN	4	0,340	0,222	0,500	1,67
MK	52	0,357	0,298	0,517	3,00
KR	4	0,399	0,279	0,583	2,00
JP	4	0,410	0,273	0,597	1,83
SD	4	0,458	0,312	0,750	2,00
RU	12	0,459	0,363	0,712	2,83
BG	24	0,463	0,384	0,625	3,17
CN	4	0,474	0,346	0,583	2,50
NN	4	0,488	0,333	0,792	2,00
UA	4	0,501	0,349	0,653	2,17
AFR	4	0,512	0,356	0,792	2,17
ET	64	0,523	0,461	0,706	4,00
TR	16	0,574	0,483	0,814	3,67
SY	4	0,610	0,423	0,903	2,50

Povprečna stopnja pričakovane heterozigotnosti (H_e) med populacijami precej variira (od 0,340 pri indijskih akcesijah do 0,610 pri sirskih), kar pomeni, da so uporabljeni mikrosatelitni markerji različno primerni za ločevanje genotipov v teh populacijah, oziroma, da so genotipi od populacije do populacije različno raznoliki. Informacijo o primernosti oziroma informativnosti uporabljenih markerjev za določene populacije nam podajo PIC vrednosti, ki naraščajo v podobnem vrstnem redu kot stopnje H_e . Potrebno je sicer upoštevati, da je število uporabljenih genotipov v posameznih populacijah zelo različno, vseeno pa rezultati kažejo, da je uporabljen set mikrosatelitnih markerjev bolj primeren za ločevanje etiopskih akcesij, kot denimo makedonskih. Povprečna števila alelov na lokus so med 1,67 (indijska populacija) in 4,00 (etiopska populacija). Pri tem parametru je še posebej opazen faktor števila genotipov, saj najvišje vrednosti dosegajo največje populacije (etiopska, makedonska, turška, bolgarska). Povprečne vrednosti H_o so za vse primere višje od vrednosti H_e , kar bi lahko kazalo na mešanje predhodno izoliranih populacij v preteklosti (McDonald, 2008).

4.2 REZULTATI MORFOLOŠKE KARAKTERIZACIJE

Tudi pri podatkih morfološke karakterizacije smo najprej opravili splošno analizo, nato pa smo se lotili pregleda po akcesijah.

V preglednici 10 je prikazan pregled nekaterih numeričnih podatkov morfološke karakterizacije. Podane so minimalne, maksimalne in povprečne vrednosti deskriptorjev ter pripadajoči standardni odkloni. Za vsak deskriptor smo poleg globalnega standardnega odklona podali tudi povprečje vseh standardnih odklonov, izračunanih za vsako akcesijo posebej.

Poleg nekaterih splošnih podatkov o preučevanih rastlinah iz preglednice 10 razberemo tudi dejstvo, da je večina prikazanih parametrov precej variabilnih in da je globalna variabilnost precej večja kot variabilnost znotraj akcesij. Izjema so poleg zadnjega deskriptorja v tabeli, ki ni variabilen, parametri, ki se tičejo vrhnjega lista, pri katerih ni jasne ločitve med akcesijami. Ostali prikazani parametri pa torej nakazujejo, da je mogoča jasna ločitev akcesij na podlagi morfoloških znakov. Tezo potrjuje tudi analiza variance ANOVA, katere rezultati so podani v prilogi D.

Preglednica 10: Globalni statistični pregled nekaterih numeričnih podatkov morfološke karakterizacije

Lastnost		Povprečna vrednost (cm)	Globalni SD ^a (cm)	Povprečni SD ^a po akcesijah (cm)	Minimum (cm)	Maksimum (cm)
Višina rastline		43,40	7,29	3,38	27,5	61
Dolžina internodijev	Prvi	7,53	1,94	0,71	3,5	14,1
	Drugi	7,86	1,48	0,82	4	12,5
	Tretji	7,70	2,04	0,89	4	13,5
	Četrty	7,48	1,84	0,84	3,4	11,9
	Peti	6,50	1,39	0,80	4,2	10,3
Dolžina bazalnega lista		4,82	0,37	0,20	4,1	6,3
Širina bazalnega lista		2,49	0,22	0,14	1,8	3,1
Dolžina srednjega lista		8,26	1,02	0,61	6	11,2
Širina srednjega lista		4,52	0,68	0,41	2,9	7
Dolžina vrhnjega lista		2,92	0,38	0,30	2	4,2
Širina vrhnjega lista		0,63	0,17	0,13	0,4	1,3
Dolžina peclja bazalnega lista		2,54	0,39	0,18	1,7	3,7
Dolžina peclja srednjega lista		3,57	0,93	0,42	2	6,4
Dolžina peclja vrhnjega lista		0,32	0,08	0,06	0,2	0,6
Št. nodijev do prvega cveta		4,55*	0,97*	0,43*	3*	7*
Št. cvetov na zalistni brst		pri vseh rastlinah: 1*				

*brez enote

SD^a – v analizo je bilo vključenih 357 rastlin iz 51 akcesij.

Pri nenumeričnih podatkih morfološke karakterizacije je zaradi narave podatkov potrebna razvrstitev v razrede. Kot lahko vidimo v preglednici 11, je ta razvrstitev za nekatere parametre enoznačna na globalni ravni naše raziskave. Gre za to, da so deskriptorji formirani za več vrst rodu *Sesamum*, zato enotna uvrstitev pri deskriptorjih osnovne morfologije ni presenetljiva. Več variabilnosti je seveda pri bolj detajlnih parametrih, kot so barva delov rastlin ali njihova dlakavost.

Podatkov o semenskih kapsulah nismo podali, saj so se le-te pojavile pri rastlinah le sedemnajstih od skupno 51 akcesij. Semena pa so vsebovale kapsule pri rastlinah samo osmih akcesij. Pri ostalih akcesijah do semena nismo prišli, zato bi bila potrebna še podrobnejša analiza pogojev rasti, ki so jih rastline imele. Vprašanje je tudi, kakšna je možnost pridelave semena pri akcesijah, kjer ni prišlo do formiranja kapsul v naših razmerah glede na to, da so med rastlinami brez pridelka največji delež predstavljale akcesije, ki izvirajo iz Etiopije, katerim bi ugodne pogoje najverjetneje težko zagotovili. Največjo količino semen so sicer proizvedle rastline populacije BG1 s povprečno štirimi kapsulami na rastlino.

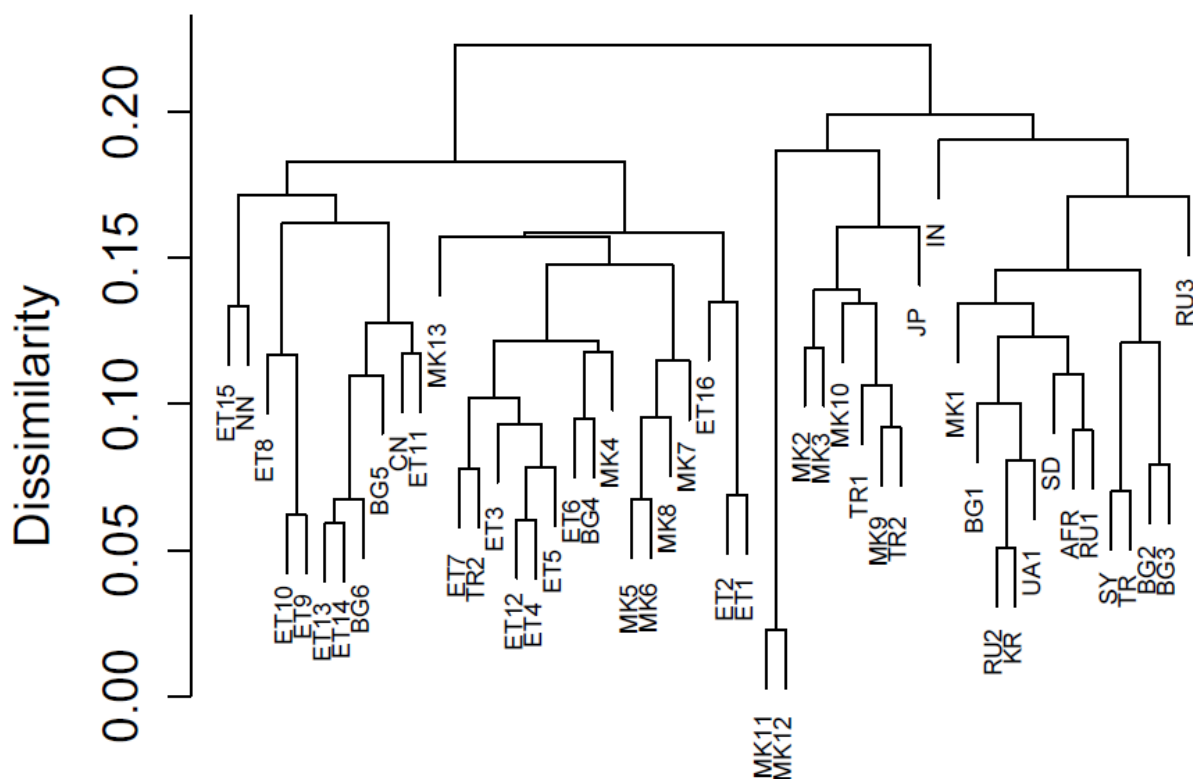
Preglednica 11: Globalni statistični pregled nekaterih nenumeričnih podatkov morfološke karakterizacije

Lastnost	Uvrstitev v razrede: %	Obrazložitev razredov*
Rastni tip	1: 100	1 - nedeterminanten
Tip koreninskega sistema	2: 100	2 - globok s tanko glavno korenino
Razporeditev listov	1: 100	1 - nasprotno pozicioniranje
Kot rasti listov (na steblo)	1: 5,9 2: 94,1	1 - ostri 2 - pravi
Barva stebila	1: 100	1 - zelena
Barva listov	1: 88,2 2: 5,9 4: 5,9	1 - zelena 2 - zelena z rumenim robom 4 - zelena z vijoličnim robom
Barva listnih pecljev	1: 37,3 2: 60,8 3: 2,0	1 - zelena 2 - zeleno vijolična 3 - vijolična
Barva cvetov	1: 6,5 2: 71,0 3: 16,1 4: 6,5	1 - bela 2 - bela z roza sledovi 3 - bela z močnimi roza sledovi 4 - roza
Dlakavost stebila	3: 39,2 5: 35,3 7: 25,5	0 - brez dlak 3 - šibko 5 - srednje 7 - močno
Dlakavost listov	0: 13,7 3: 58,8 5: 23,5 7: 3,9	
Dlakavost listnih pecljev	3: 43,1 5: 27,5 7: 29,4	
Dlakavost časnih listov	3: 23,5 5: 26,5 7: 50,0	
Dlakavost venčnih listov	5: 14,7 7: 85,3	

*Razredi so definirani po mednarodnih deskriptorjih (Bioversity International).

Podrobnejši podatki morfološke karakterizacije vseh akcesij so prikazani v prilogi E.

Na koncu smo podatke morfološke karakterizacije obdelali še s posebnimi paketi v programskem okolju R (podrobneje v poglavju Materiali in metode). Na podlagi morfoloških podatkov smo tako populacije razvrstili v dendrogram glede na stopnjo morfološke različnosti. Dendrogram je prikazan na sliki 8.



Slika 8: Dendrogram, v katerem so populacije razvrščene glede na stopnjo morfološke različnosti

Pri branju dendrograma upoštevamo pravilo, da se stopnja različnosti razbere iz višine horizontalne črte, ki dve izbrani populaciji povezuje.

Pri dendrogramu je opaziti delitev populacij na dve večji skupini. Makedonske, bolgarske in turške akcesije se pojavljajo v obeh skupinah, medtem ko so ruske populacije prisotne le v skupini, ki se deli desno. V tej skupini je tudi edina ukrajinska akcesija. V drugi, levi skupini pa se nahajajo vse etiopske akcesije. V splošnem bi pri dendrogramu morfologije pričakovali bolj jasno delitev glede na geografski izvor, vendar smo že pri merjenjih v rastlinjaku opažali, da bi akcesije glede na morfologijo vsaj na prvi pogled težko grupirali po državah izvora.

4.3 POVEZAVA GENETIKA – MORFOLOGIJA

Razporeditev populacij na dendrogramu, pridobljenem na osnovi morfologije akcesij (slika 8), se od tiste z drevesa populacijskih genetskih razdalj (slika 7) precej razlikuje. Pravzaprav gre za dve različni razporeditvi z redkimi podobnostmi (kot so denimo medsebojna lega populacij ET1 in ET2, ali pa bližnja lega MK11 in MK12).

4.3.1 Rezultat Mantelovega testa

Zgolj z opazovanjem in primerjanjem rezultatov je povezave genetskih in morfoloških podatkov težko oceniti. Zato smo naredili Mantelov test, pri katerem smo primerjali skladnost genetske in morfološke matrike vključenih akcesij.

Mantelov koeficient r_{xy} , ki v naši analizi predstavlja merilo skladnosti obeh matrik, je dosegel pozitivno vrednost, in sicer 0,132 ($p = 0,04$; $y = 0,0597x + 5,7011$). Izračunana vrednost predstavlja šibko povezanost med rezultati genetske analize na nivoju DNA in morfološkega vrednotenja vključenih akcesij. Odstopanja med obema obravnavanjema so lahko posledica dejstva, da ima na morfološke znake velik vpliv okolje. Poleg tega smo s šestimi mikrosatelitnimi markerji zaobjeli le majhen del celotne genetske raznolikosti, medtem ko je bilo ocenjenih morfoloških znakov precej več. Pri drugih podobnih študijah sezama so rezultati takih primerjav podobni. Tabatabaei in sod. (2011) pri primerjavi med rezultati genetske analize in morfološke karakterizacije poročajo o opaženi korelaciji, ki pa je šibka. Ali in sod. (2007) pa so našli povezavo med AFLP vzorci in nekaterimi morfološkimi karakteristikami akcesij, kot so vejanje, število cvetov, tip kapsule in barva semenske ovojnice.

5 SKLEPI

Izolacija genomske DNA z robotom MagMax in z uporabo laboratorijskega kompleta se je pri sezamu izkazala kot hitra in učinkovita, kar je potrdilo merjenje koncentracij s fluorimetrom. Izmerjene vzorčne koncentracije DNA so znašale od 50 ng/μl do 232 ng/μl, kar količinsko pomeni od 4,5 μg do 20,9 μg DNA na vzorec. Za učinkovito se je izkazala verižna reakcija s polimerazo – PCR z uporabo univerzalnih fluorescentno označenih začetnih oligonukleotidov za označevanje produktov. Natančna in hitra pa je bila tudi fragmentna analiza z genetskim analizatorjem ABI 3130 XL.

Z uporabo mikrosatelitnih markerjev smo večino akcesij dobro ločili. Glede na število uporabljenih različnih akcesij smo sicer pričakovali nekoliko višjo stopnjo variabilnosti. Res pa je, da je bila v našem primeru povprečna pričakovana heterozigotnost (H_e) višja (0,518) kot v primeru prve objave začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabili (H_e je znašala 0,29) (Pham, 2011). Dejstvo je, da so rezultati odvisni od kombinacije nabor markerjev – vključeni genotipi. Menimo, da je nabor uporabljenih mikrosatelitnih markerjev v našem primeru solidno informativen (informacijska vrednost polimorfizma (PIC) je 0,466). Pri karakterizaciji nekaterih makedonskih akcesij, ki so očitno med seboj zelo sorodne, pa bi bilo koristno uporabiti še kakšen dodaten marker več.

Rezultati analize genetske raznolikosti s pomočjo mikrosatelitnih markerjev kažejo, da so se akcesije iz bližnjih geografskih območij v večini primerov razvrstile v skupine (skupine: MK1, MK2, MK3, MK4, MK6, MK7, MK8; MK5, MK11, MK12; BG2, BG3; BG4, BG5, BG6; RU2, UA1; ET1, ET2), vendar so nekoliko presenetljivo v nekaterih primerih genetsko blizu akcesije, ki izhajajo iz medsebojno oddaljenih območij (npr. več etiopskih akcesij je genetsko blizu bolgarskim BG4, BG5 in BG6).

Dejanska heterozigotnost se med akcesijami precej razlikuje (razpon od 0,250 do 0,958). Vrednosti kažejo na to, da sezam ni povsem samoprašna rastlina, kar potrjuje ugotovitve več avtorjev (Khidir, 1972; Bedigan in sod., 1986; Ashri, 1998).

Pri obdelavi podatkov se je pokazalo, da so ocene frekvenc ničtih alelov za vse lokuse negativne, ničti aleli pa so se v raziskavi kljub temu pojavljali. Vseeno menimo, da so pojavljajoči se ničti aleli pravi in niso rezultat morebitnih napak v postopkih, ki so sicer precej zanesljivi.

Pri morfološki karakterizaciji smo za večino numeričnih parametrov ugotovili visoko stopnjo variabilnosti med akcesijami in nizko znotraj akcesij. Pri nenumeričnih parametrih opazamo majhno variabilnost pri ocenah osnovne morfologije in večjo pri bolj detajlnih parametrih, kar glede na širšo zastavljenost pripravljenih deskriptorjev ne preseneča (Descriptors ..., 2004).

Programsko okolje R se je skupaj s paketoma »gclus« in »vegan« izkazalo za primeren in uporaben način za skupno obdelavo različnih tipov podatkov morfološke karakterizacije.

Na osnovi podatkov analize morfologije izrisan dendrogram kaže drugačno grupiranje akcesij, kot bi jih uvrstili po genetski karakterizaciji. Rezultati Mantelovega testa skladnosti genetske in morfološke matrike vključenih akcesij kažejo na šibko povezanost med podatki (Mantelov koeficient je dosegel pozitivno vrednost 0,132), kar je v skladu s študijama Tabatabaei in sod. (2011) in Ali in sod. (2007).

Glede primernosti za gojenje pri nas se je najbolj izkazala bolgarska sorta 'Sofiya' (ki smo jo v nalogi vodili kot populacijo BG1), pri kateri je ena rastlina v povprečju producirala po 4 kapsule s semeni. Za rabo v intenzivni uporabi to seveda ne bi bilo dovolj. V kolikor bi se ob vseh podnebnih spremembah pokazala niša za gojenje sezama pri nas, bi bilo potrebno izboru primernih sort nameniti veliko pozornosti. V tem primeru bi za zgled lahko vzeli Italijo, ki pri gojenju sezama dosega najvišje donose na hektar (FAOSTAT ..., 2013).

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Sezam (*Sesamum indicum* L.) je rastlina iz družine Pedaliaceae in velja za najstarejšo oljnico. Cenjen je predvsem zaradi svojega kakovostnega in bogatega olja, poleg tega pa je razširjena tudi uporaba celih semen.

Mikrosateliti so tandemsko ponavljajoča se zaporedja DNA, pri katerih je enota ponovitve dolga od 2–8 bp. Zaradi njihove variabilnosti in pogostosti pojavljanja v genomu se jih uporablja kot molekularne markerje. V nalogi smo s pomočjo mikrosatelitov opravili analizo genetske raznolikosti 51 pridobljenih genskih virov sezama.

Celokupno DNA smo izolirali z robotom za izolacijo nukleinskih kislin MagMax, pri čemer smo uporabili Quiagen Biosprint DNA Plant kit (Mediline). Z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) smo pridobili fluorescentno označene pomnožitve šestih mikrosatelitnih lokusov, ki smo jih poslali na fragmentno analizo z genetskim analizatorjem ABI 3130 XL (Applied Biosystems).

Pridobljene podatke o mikrosatelitih smo analizirali s programom Excel Microsatellite Toolkit 3.1.1 ter nadalje s programi Populations 1.2.30, IDENTITY 1.0, Fstat in TreeView. Najprej smo opravili globalno analizo podatkov po lokusih, nato pa smo se posvetili posameznim akcesijam.

Nabor uporabljenih mikrosatelitnih markerjev se je izkazal za solidno informativnega ($PI_C = 0,466$), povprečna vrednost H_e je bila 0,518.

Opravili in analizirali smo parne primerjave genotipov in izrisali drevo standardnih genetskih razdalj med populacijami.

Z genotipizacijo smo ugotovili, da je akcesije iz bližnjih geografskih območij mogoče razvrstiti v skupine, vendar so v nekaterih primerih genetsko blizu akcesije, ki izhajajo iz medsebojno oddaljenih območij.

Drugi del naloge je bila analiza morfološke raznolikosti. V ta namen smo mlade rasline presadili v lonce s substratom in prenesli v rastlinjak, kjer jih je zalival avtomatski namakalni sistem. Tekom rasti smo jih ocenjevali po mednarodnih (Bioversity International) deskriptorjih. Pri obdelavi podatkov morfološke karakterizacije smo poleg preprostejših izračunov v programu Microsoft Excel uporabili tudi paketa »gclus« in »vegan« v programskem okolju R, pri čemer smo se posluževali priročnika *Statistical Analysis for Plant Genetic Resources: Clustering and indices in R made simple* (Grum in Atieno, 2007).

Za numerične parametre ocene morfologije smo opravili analizo variance ANOVA. Pri večini parametrov smo ugotovili visoko stopnjo variabilnosti med akcesijami in nizko znotraj akcesij. Nenumerični parametri, ki se tičejo osnovne morfologije, kažejo majhno variabilnost, pri bolj specialnih pa je le-ta višja.

Na osnovi podatkov analize morfologije smo izrisali dendrogram, ki smo ga primerjali z drevesom standardnih genetskih razdalj. Za primerjavo genetske in morfološke matrike smo opravili Mantelov test, ki je pokazal šibko povezavo (Mantelov koeficient $r_{xy} = 0,132$).

6.2 SUMMARY

Sesame (*Sesamum indicum* L.) is a plant of a Pedaliaceae family and is considered to be the oldest oilseed crop. It is appreciated because of its oil quality and richness, and its whole seeds are widely used as well.

Microsatellites are repeating sequences of 2–8 base pairs of DNA. Because of their high variability and frequency in eucariotic genomes they are used as molecular markers. In this thesis we performed genetic analysis of 51 sesame accessions using microsatellite molecular markers.

We isolated genomic DNA using MagMax robotic extractor and Quiagen Biosprint DNA Plant kit (Mediline). Six loci were amplified by polymerase chain reaction (PCR). During PCR reaction products were also fluorescently labeled. Amplified fragments were then sent to fragment analysis, which was performed by genetic analyzer ABI 3130 XL (Applied Biosystems).

Microsatellite data were then analyzed by Excel Microsatellite Toolkit 3.1.1, and furthermore by programs Populations 1.2.30, IDENTITY 1.0, Fstat and TreeView. First of all global loci analysis was performed and then population data analysis was accomplished.

The set of microsatellite primers appear to be quite informative ($PIC = 0,466$). Mean expected heterozygosity was 0,518.

We compared genotypes and analyzed the matching pairs. We also constructed the tree of genetic relationships between populations using standard genetic distance method.

Accessions that originate from neighboring geographic regions can mostly be grouped together, but in some cases geographically distant accessions are genetically very similar.

The second part of the thesis was morphological characterization. Young sesame plants were transplanted into pots with a substrate and transferred to the greenhouse, where they were watered by an automatic irrigation system. We characterized plants using Bioversity International descriptors. Obtained data were processed by »gclus« and »vegan« packages

in R programming environment (We used guide *Statistical Analysis for Plant Genetic Resources: Clustering and indices in R made simple* (Grum in Atieno, 2007)). Some basic calculations were made in Microsoft Excel.

Analysis of variance was performed on numerical descriptors. It mostly showed high variation among populations and low variation within populations. Non-numerical descriptors of basic morphology show low variability, while it is higher in case of descriptors of more detailed features.

Dendrogram constructed on the base of processed data of morphological characterization shows quite different distribution of populations than the tree of genetic relationships between populations. Mantel test was used for the comparison between genetic and morphological matrix. It shows a weak correlation between morphological and genetic data.

7 VIRI

- Abdellatef E., Sirelkhatem R., Ahmed M. M. M., Radwan K. H., Khalafalla M. M. 2008. Study of genetic diversity in Sudanese sesame (*Sesamum indicum* L.) germplasm using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *African Journal of Biotechnology*, 7, 24: 4423-4427
- Ahmad R., Potter D., Southwick S. M. 2004. Identification and characterization of plum and pluot cultivars by microsatellite markers. *Journal of horticultural science & biotechnology*, 79, 1: 164-169
- Ali G. M., Yasumoto S., Seki-Katstua M. 2007. Assessment of genetic diversity in sesame (*Sesamum indicum* L.) detected by Amplified Fragment Length Polymorphism markers. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10, 1: 12-23
- Anilakumar K. R., Pal A., Khanum F., Bawa A. S. 2010. Nutritional, medicinal and industrial uses of sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds – an overview. *Afruculturae Conspectus Scientificus*, 75, 4: 159-168
- Armour J. A. L., Alegre S. A., Miles S., Williams L. J., Badge R. M. 1999. Minisatellites and mutation processes in tandemly repetitive DNA. V: *Microsatellites – evolution and applications*. Goldstein D. B., Schlötterer C. (eds.). Oxford, Oxford University Press: 24-33
- Ashri A. 1998. Sesame breeding. V: *Plant Breeding Reviews*. Vol. 16. Janick J. (ed.). Oxford, John Wiley & Sons: 179-228
- Bedigan D., Harlan J. R. 1986. Evidence for cultivation of sesame in the ancient world. *Economic Botany*, 40, 2: 137-154
- Bedigan D., Smyth C. A., Harlan J. R. 1986. Patterns of morphological variation in *Sesamum indicum*. *Economic Botany*, 40, 3: 353-365
- Bedigan D. 2004. History and lore of sesame in Southwest Asia. *Economic Botany*, 58, 3: 329-353
- Bhat K. V., Babrekar P. P., Lakhanpaul S. 1999. Study of genetic diversity in Indian and exotic sesame (*Sesamum indicum* L.) germplasm using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Euphytica*, 110, 1: 21-34
- Bisht I. S., Mahajan R. K., Loknathan T. R., Agrawal R. C. 1998. Diversity in Indian sesame collection and stratification of germplasm accessions in different diversity groups. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 45: 325-335
- Biton I., Shevtsov S., Ostersetzer O., Mani Y., Lavee S., Avidan B., Ben-Ari G. 2012. Genetic relationships and hybrid vigour in olive (*Olea europaea* L.) by microsatellites. *Plant Breeding*, 131, 6: 767-774

- Callen D. F., Thompson A. D., Shen Y., Philips H. A., Richards R. I., Mulley J. C., Sutherland G. R. 1993. Incidence and origin of null alleles in the (AC)_n microsatellite markers. *American Journal of Human Genetics*, 52: 922-927
- Chakraborty G. S., Sharma G., Kaushik K. N. 2008. *Sesamum indicum*: a review. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology*, 2, 2: 15-19
- Chistiakov D. A., Hellemans B., Volckaert F. A. M. 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*, 255, 4: 1-29
- Collard B. C. Y., Mackill D. J. 2007. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363, 1491: 557-572
- Descriptors for sesame (*Sesamum* spp.). 2004. Rome, International Plant Genetic Resources Institute: 63 str.
- Dixit A., Jin M. H., Chung J. W., Yu J. W., Chung H. K., Ma K. H., Park Y. J., Cho E. G. 2005. Development of polymorphic microsatellite markers in sesame (*Sesamum indicum* L.). *Molecular Ecology Notes*, 5: 736-738
- Ellis R. H., Hong T. D., Roberts E. H. 1985. Handbook of seed technology for genebanks. Vol. 2. Rome, International Board for Plant Genetic Resources: 715 str.
- Ercan A. G., Taskin M., Turgut K. 2004. Analysis of genetic diversity in Turkish sesame (*Sesamum indicum* L.) populations using RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 51: 799-607
- Esquinas-Alcázar J. 2005. Protecting crop genetic diversity for food security: political, ethical and technical challenges. *Nature Reviews Genetics*, 6: 946-953
- Estoup A., Cournet J. M., Rousset F., Guyomard R. 1999. Juxtaposed microsatellite systems as diagnostic markers for admixture: theoretical aspects. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 898-908
- Fang X., Willis R. C., Burrell A., Evans K., Hoang Q., Xu W., Buopheng M. 2007. Automation of nucleic acid isolation on KingFisher magnetic particle processors. *Journal of the Association for Laboratory Automation*, 12: 195-201
- FAOSTAT. 2013. Rome, Food and Agricultural Organization of the United Nations. <http://faostat.fao.org> (8. jan. 2013)
- Flajoulot S., Ronfort J., Baudoin P., Barre P., Huguet T., Huyghe C., Julier B. 2005. Genetic diversity among alfalfa (*Medicago sativa*) cultivars coming from a breeding program, using SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 111, 7: 1420-1429

FSTAT. 2005. Lausanne, University of Lausanne.

<http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm> (9. sep. 2012)

Gaudeul M., Till-Bottraud I., Barjon F., Manel S. 2004. Genetic diversity and differentiation in *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae): comparison of AFLP and microsatellite markers. *Heredity*, 92: 508-518

Grum M., Atieno F. 2007. Statistical analysis for plant genetic resources: clustering and indices in R made simple. Rome, Bioversity International: 40 str.

Hagan A., Gazaway W., Sikora E. 1998. Nematode Suppressive Crops. Auburn, Alabama Cooperative Extension System: 4 str.

<http://www.aces.edu/pubs/docs/A/ANR-0856/ANR-0856.pdf> (8. feb. 2013)

He C., Poysa V., Yu K. 2003. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in determining relationships among *Lycopersicon esculentum* cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 106, 2: 363-373

Iwata H., Hayashi T., Terakami S., Takada N., Sawamura Y., Yamamoto T. 2013. Potential assessment of genome-wide association study and genomic selection in Japanese pear *Pyrus pyrifolia*. *Breeding Science*, 63, 1: 125-140

Jenkins J. N., McCarty J. C., Wubben M. J., Hayes R., Gutierrez O. A., Callahan F., Deng D. 2012. SSR markers for marker assisted selection of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) resistant plants in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Euphytica*, 183: 49-54

Kenis K., Keulemans J. 2005. Genetic linkage maps of two apple cultivars (*Malus x domestica* Borkh.) based on AFLP and microsatellite markers. *Molecular Breeding*, 15, 2: 205-219

Khidir M. O. 1972. Natural cross-fertilization in sesame under Sudan conditions. *Experimental Agriculture*, 8: 55-59

Kim D. H., Zur G., Danin-Poleg Y., Lee S. W., Shim K. B., Kang C. W., Kashi Y. 2002. Genetic relationships of sesame germplasm collection as revealed by inter-simple sequence repeats. *Plant Breeding*, 121, 3: 259-262

Kobayashi T., Kinoshita M., Hattori S., Ogawa T., Tsuboi Y., Ishida M., Ogawa S., Saito H. 1990. Development of the sesame metallic fuel performance code. *Nuclear Technology*, 89, 2: 183-193

Laurentin H. E., Karlovsky P. 2006. Genetic relationship and diversity in a sesame (*Sesamum indicum* L.) germplasm collection using amplified fragment length polymorphism (AFLP). *BMC Genetics*, 7, 10: 1-10
doi:10.1186/1471-2156-7-10

- Maas E. V. Testing crops for salinity tolerance. V: Workshop on adaptation of plants to soil stresses. Maranville J. W., Baligar B. V., Duncan R. R., Yohe J. M. (eds.). Lincoln, University of Nebraska: 234-247
- Mackay J. F., Wright C. D., Bonfiglioli R. G. 2008. A new approach to varietal identification in plants by microsatellite high resolution melting analysis: application to the verification of grapevine and olive cultivars. *Plant Methods*, 4, 8: 1-10
doi:10.1186/1746-4811-4-8
- Mantel N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27: 209-220
- McDonald D. 2008. Genetic markers. Laramie, University of Wyoming: 3 str.
<http://www.uwyo.edu/dbmcd/molmark/index.html> (8. jun. 2013)
- McPherson M. J., Møller S. G. 2006. PCR. 2nd ed. Abingdon, Taylor & Francis Group: 292 str.
- Merdinoglu D., Butterlin G., Bevilacqua L., Chiquet V., Adam-Blondon A. F., Decroocq S. 2005. Development and characterization of a large set of microsatellite markers in grapevine (*Vitis vinifera* L.) suitable for multiplex PCR. *Molecular Breeding*, 15, 4: 349-366
- Montinaro F., Boschi I., Trombetta F., Merigioli S., Anagnostou P., Battaggia C., Capocasa M., Crivellaro F., Destro B. G., Coila V. 2012. Using forensic microsatellites to decipher the genetic structure of linguistic and geographic isolates: a survey in the eastern Italian Alps. *Forensic Science International: Genetics*, 6, 6: 827-833
- Morris J. B. 2002. Food, industrial, nutraceutical, and pharmaceutical uses of sesame genetic resources. V: Trends in new crops and new uses. Janick J., Whipkey A. (eds.). Alexandria, ASHS Press: 153-156
- Nayar N. M., Mehra K. L., 1970. Sesame – its uses, botany, cytogenetics, and origin. *Economic Botany*, 24: 20-31
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106: 283-291
- Oliveira E. J., Pádura J. G., Zucchi M. I., Vencovsky R., Vieira M. L. C. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 2: 294-307
- Orti G., Pearse D. E., Avise J. C. 1997. Phylogenetic assessment of length variation at a microsatellite locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94: 10745-10749
- Peakall R., Smouse P. E. 2006. GENEALX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 1: 288-295

- Pham T. D., Nguyen T. D. T., Carlsson A. S., Bui T. M. 2010. Morphological evaluation of sesame (*Sesamum indicum* L.) varieties from different origins. *Australian Journal of Crop Science*, 4, 7: 498-504
- Pham T. D. 2011. Analyses of genetic diversity and desirable traits in sesame (*Sesamum indicum* L., Pedaliaceae): implication for breeding and conservation. Alnarp, Swedish University of Agricultural Sciences: 52 str.
- Pipan B. 2012. Protokol za izolacijo DNA na MagMax. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 1 str. [interno gradivo]
- Saydut A., Duz M. Z., Kaya C., Kafadar A. B., Hamamci C. 2008. Transesterified sesame (*Sesamum indicum* L.) seed oil as a biodiesel fuel. *Bioresource Technology*, 99, 14: 6656-6660
- Schlötterer C. 2004. The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics*, 5: 63-69
- Schuelke M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18: 233-234
- Selkoe K. A., Toonen R. J. 2006 Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9: 615-629
- Sesame producer guide 2012. 2012. Austin, Sesaco: 23 str.
- Sicherer S. H., Muñoz-Furlong A., Godbold J. H., Sampson H. A. 2010. US prevalence of self-reported peanut, tree nut, and sesame allergy: 11-year follow-up. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125, 6: 1322-1326
- Sneath P. H. A., Sokal R. R. 1973. Numerical taxonomy. San Francisco, W. H. Freeman and Company: 573 str.
- Spooner D., Van Treuren R., Vicente M. C. 2005. Molecular markers for genebank management. Rome, International Plant Genetic Resources Institute: 126 str.
- Štajner N. 2010. Mikrosatelitski markerji uporabni za identifikacijo kultivarjev vinske trte (*Vitis vinifera* L.). *Acta agriculturae Slovenica*, 95, 2: 183-192
- Tabatabaei I., Pazouki L., Bihamta M. R., Mansoori S., Javaran M. J. Niinemets Ü. 2011. Genetic variation among Iranian sesame (*Sesamum indicum* L.) accessions vis-à-vis exotic genotypes on the basis of morpho-physiological traits and RAPD markers. *Australian Journal of Crop Science*, 5, 11: 1396-1407
- Tengberg M. 1999. Crop husbandry at Miri Qalat, Makran, SW Pakistan (4000-2000 B.C.). *Vegetation History and Archaeobotany*, 8: 3-12

- Uzun B., Arslan Ç., Furat Ş. 2008. Variation in fatty acid compositions, oil content and oil yield in a germplasm collection of sesame (*Sesamum indicum* L.). Journal of the American Oil Chemists' Society, 85: 1135-1142
- Van Inghelandt D., Melchinger A. E., Lebreton C., Stich B. 2010. Population structure and genetic diversity in a commercial maize breeding program assessed with SSR and SNP markers. Theoretical and Applied Genetics, 120, 7: 1289-1299
- Varshney R. K., Graner A., Sorrells M. E. 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. Trends in Biotechnology, 23, 1: 48-55
- Wagner H. W., Sefc K. M. 1999. IDENTITY 1.0. Vienna, Centre for Applied Genetics, University of Agricultural Sciences Vienna: 5 str.
- Wang H., Smith K. P., Combs E., Blake T., Horsley R. D., Muehlbauer G. J. 2012. Effect of population size and unbalanced data sets on QTL detection using genome-wide association mapping in barley breeding germplasm. Theoretical and Applied Genetics, 124, 1: 111-124
- Wei L. B., Zhang H. Y., Zheng Y. Z., Guo W. Z., Zhang T. Z. 2008. Developing EST-derived microsatellites in sesame (*Sesamum indicum* L.). Acta Agronomica Sinica, 34, 12: 2077-2084
- Wei W., Qi X., Wang L., Zhang Y., Hua W., Li D., Lv H., Zhang X. 2011. Characterization of the sesame (*Sesamum indicum* L.) global transcriptome using Illumina paired-end sequencing and development of EST-SSR markers. BMC Genomics, 12, 451: 1-13
doi:10.1186/1471-2164-12-451
- Zhang H., Miao H., Wang L., Qu L., Liu H., Wang Q., Yue M. 2013. Genome sequencing of the important oilseed crop *Sesamum indicum* L. Genome Biology, 14, 401: 1-9
doi:10.1186/gb-2013-14-1-401

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju dr. Vladimirju Megliču, ki je vodil moje delo in omogočil nastanek te naloge. Posebej se zahvaljujem dr. Barbari Pipan za prijaznost in izdatno strokovno pomoč pri laboratorijskem delu in vseh nadaljnjih korakih izdelave naloge. Zahvaljujem se tudi Boštjanu Lipavicu za pomoč pri poskusu v rastlinjaku in vsem zaposlenim s Kmetijskega inštituta Slovenije, s katerimi sem pri svojem delu sodeloval. Iskrena zahvala gre tudi ženi Nataši za moralno podporo.

PRILOGA A

Seznam v nalogi uporabljenih akcesij s podatki o njihovem poreklu in kratičnimi oznakami, ki smo jih v nalogi uporabili

Pridobljeno ime akcesij	Poreklo	Uporabljene kratice
MKD 00304 (D)	Makedonija	MK1
MKD 00305	Makedonija	MK2
MKD 00306	Makedonija	MK3
MKD 00307	Makedonija	MK4
MKD 00308	Makedonija	MK5
MKD 00309	Makedonija	MK6
MKD 00310	Makedonija	MK7
MKD 00311	Makedonija	MK8
MKD 00312	Makedonija	MK9
MKD 00313	Makedonija	MK10
MKD 03381	Makedonija	MK11
MKD 03381a	Makedonija	MK12
"MAK SEZAM?"	Makedonija	MK13
'Sofiya'	Bolgarija	BG1
'Sadovo 1'	Bolgarija	BG2
'Milena'	Bolgarija	BG3
ACC-BG-010	Bolgarija	BG4
ACC-BG-012 (3)	Bolgarija	BG5
BG-004 (1)	Bolgarija	BG6
Вхиимк (UE 1000016)	Rusija	RU1
Мечтбиѳ (UE 1000013)	Rusija	RU2
Кубапец 93 (UE 1000004)	Rusija	RU3
Надежда (UE 1000001)	Ukrajina	UA1
'Lizlin'	Turčija	TR1
'Mugarli'	Turčija	TR2
'Gölmarnara'	Turčija	TR3
Tesahir Gobate	Etiopija	ET1
Tejareb	Etiopija	ET2
Hirhir Humera Sel-3	Etiopija	ET3
Humera Type Hirhir	Etiopija	ET4
Mikadra	Etiopija	ET5
Hirhir Fluha Large Seed	Etiopija	ET6

se nadaljuje

nadaljevanje

Pridobljeno ime akcesij	Poreklo	Uporabljene kratice
Margo Selection	Etiopija	ET7
Gojam Arene (Aleka)	Etiopija	ET8
J-02	Etiopija	ET9
J-03	Etiopija	ET10
ACC-00008	Etiopija	ET11
ACC-EW-012 (1)	Etiopija	ET12
ACC-EW-015 (1)	Etiopija	ET13
ACC-EW-017 (5)	Etiopija	ET14
ACC-EW-025 (1)	Etiopija	ET15
SPS-SIK-98-2	Etiopija	ET16
WW-04	Neznano	NN
TURKEY	Turčija	TR
SYRIA	Sirija	SY
SUDAN-2	Sudan	SD
INDIA-3	Indija	IN
AFRICA-3	Afrika	AFR
CHINA-2	Kitajska	CN
KOREA-1	Južna Koreja	KR
JAPAN-2	Japonska	JP

PRILOGA B

Protokoli za pripravo nekaterih pufrov, ki smo jih uporabili v sklopu analize genetske variabilnosti pri delu z DNA

TE pufer:

- 10 ml 1M Tris – HCl, pH 8
- 2 ml 0,5M EDTA, pH 8
- Dolijemo dH₂O do 1000 ml.

TBE (5X) pufer:

- 54 g Tris baze
- 27,5 g Borove kisline
- Raztopimo v cca. 900 ml dH₂O.
- Dodamo 20 ml 0,5 M EDTA, pH 8.
- Dolijemo dH₂O do 1000 ml.
- Za pripravo 0,5X TBE pufra redčimo 5X TBE z dH₂O v razmerju 1 : 10.

TNE pufer:

- 12,11 g Tris baze
- 3,72 g EDTA
- 116,89 NaCl
- Raztopimo v cca. 800 ml dH₂O.
- Uravnamo pH na 7,4 s koncentrirano raztopino HCl.
- Dolijemo dH₂O do 1000 ml.
- Dobimo 10X TNE pufer (100mM Tris; 2.0M NaCl; 10mM EDTA; pH 7.4).

PRILOGA C

Celoten pregled dejanske heterozigotnosti in povprečnega števila alelov/lokus znotraj populacij (akcesij)

Populacija	Ho	Povprečno število alelov/lokus
MK3	0,292	1,33
MK1	0,250	1,50
MK2	0,417	1,50
MK4	0,333	1,50
MK6	0,292	1,67
MK7	0,375	1,67
MK8	0,417	1,67
BG3	0,458	1,67
ET5	0,625	1,67
ET16	0,667	1,67
IN	0,500	1,67
MK5	0,639	1,83
MK10	0,569	1,83
MK13	0,625	1,83
ET6	0,667	1,83
JP	0,597	1,83
RU2	0,833	1,83
BG1	0,417	2,00
ET1	0,639	2,00
ET3	0,736	2,00
ET7	0,736	2,00
ET9	0,667	2,00
ET10	0,708	2,00
ET11	0,681	2,00
ET13	0,833	2,00
ET14	0,736	2,00
NN	0,792	2,00
BG6	0,750	2,00
SD	0,750	2,00
KR	0,583	2,00
RU3	0,708	2,00

se nadaljuje

nadaljevanje

Populacija	Ho	Povprečno število alelov/lokus
MK9	0,750	2,17
BG2	0,583	2,17
ET2	0,500	2,17
ET8	0,750	2,17
ET12	0,792	2,17
ET15	0,792	2,17
BG4	0,750	2,17
BG5	0,792	2,17
TR	0,736	2,17
AFR	0,792	2,17
RU1	0,597	2,17
UA1	0,653	2,17
MK11	0,917	2,17
TR1	0,958	2,33
TR2	0,875	2,33
MK12	0,875	2,33
TR3	0,708	2,50
SY	0,903	2,50
CN	0,583	2,50
ET4	0,750	3,00
Povprečje	0,654	2,00

PRILOGA D

Pregled vrednosti analize variance ANOVA za nekatere numerične deskriptorje

Lastnost		Vsota kvadratov odklonov-VKO			Stopnja prostosti			Srednji kvadrirani odklon-SKO		F	P - vrednost
		Znotraj akcesij	Med akcesijami	Skupaj	Znotraj akcesij	Med akcesijami	Skupaj	Znotraj akcesij	Med akcesijami		
Višina rastline		1831,37	6945,92	8777,28	115	50	165	15,92	138,92	8,72	$8,22 \cdot 10^{-22}$
Dolžina internodijev	Prvi	74,61	496,28	570,89	102	50	152	0,73	9,93	13,57	$8,13 \cdot 10^{-28}$
	Drugi	102,69	230,60	333,29	102	50	152	1,01	4,61	4,58	$3,93 \cdot 10^{-11}$
	Tretji	114,48	520,97	635,45	102	50	152	1,12	10,42	9,28	$2,66 \cdot 10^{-21}$
	Četrty	101,01	413,96	514,97	102	50	152	0,99	8,28	8,36	$1,29 \cdot 10^{-19}$
	Peti	96,33	195,83	292,16	102	50	152	0,94	3,92	4,15	$5,98 \cdot 10^{-10}$
Dolžina bazalnega lista		6,13	14,89	21,02	102	50	152	0,06	0,30	4,95	$4,2 \cdot 10^{-12}$
Širina bazalnega lista		2,65	4,77	7,42	102	50	152	0,03	0,10	3,68	$1,28 \cdot 10^{-08}$
Dolžina srednjega lista		53,81	104,34	158,15	102	50	152	0,53	2,09	3,96	$2,06 \cdot 10^{-09}$
Širina srednjega lista		25,08	45,65	70,73	102	50	152	0,25	0,91	3,71	$1,02 \cdot 10^{-08}$
Dolžina vrhnjega lista		12,87	8,93	21,81	102	50	152	0,13	0,18	1,42	0,0706
Širina vrhnjega lista		2,42	1,82	4,24	102	50	152	0,02	0,04	1,53	0,0350
Dolžina peclja bazalnega lista		4,33	19,06	23,40	102	50	152	0,04	0,38	8,97	$9,45 \cdot 10^{-21}$
Dolžina peclja srednjega lista		27,98	104,32	132,30	102	50	152	0,27	2,09	7,61	$3,81 \cdot 10^{-18}$
Dolžina peclja vrhnjega lista		0,580	0,347	0,93	102	50	152	0,006	0,007	1,22	0,197
Št. nodijev do prvega cveta		38,27	125,18	163,45	123	50	173	0,31	2,50	8,05	$3,31 \cdot 10^{-21}$

PRILOGA E

Pregled morfološke karakterizacije z vrednotmi vseh deskriptorjev (številčne oznake deskriptorjev so povzete po Descriptors... (2004)) za vse akcesije

Št. deskriptorja*	Deskriptor\Populacija	MK1	MK2	MK3	MK4	MK5	MK6
7.2.1	Tip rasti	1	1	1	1	1	1
7.2.2	Oblika rasti	3	3	3	3	3	3
7.2.3	Koreninski sistem	2	2	2	2	2	2
7.3.1	Višina rastline (cm)	32,1	37,0	37,0	39,7	38,6	40,6
7.3.2	Barva stebila	1	1	1	1	1	1
7.3.3	Dlakavost stebila	7	5	7	5	5	5
7.3.4	Oblika dlak	2	3	3	2	2	2
7.3.5	Oblika stebila v prerezu	2	2	2	2	2	2
7.3.6	Stebelna fasciacija	1	1	1	1	1	1
7.3.7	Vejanje stebila	1	1	1	1	1	1
7.3.8	Vzorec vejanja	2	2	2	2	2	2
7.3.9 prvi	Dolžina internodijev (cm)	5,7	5,8	7,4	5,8	7,1	7,7
7.3.9 drugi	Dolžina internodijev (cm)	6,0	6,2	7,8	6,1	7,4	8,0
7.3.9 tretji	Dolžina internodijev (cm)	6,4	7,6	7,9	8,9	8,8	8,8
7.3.9 četrti	Dolžina internodijev (cm)	5,8	7,7	5,6	7,0	7,1	7,2
7.3.9 peti	Dolžina internodijev (cm)	4,8	6,7	4,6	6,0	6,1	6,2
7.4.1	Barva listov	1	1	1	1	1	1
7.4.2	Dlakavost listov	3	3	3	3	3	3
7.4.3	Oblika dlak	1	1	1	1	1	1
7.4.4	Razporeditev listov	1	1	1	1	1	1
7.4.5 bazalni	Oblika listov	4	3	3	4	3	3
7.4.5 vrhnji	Oblika listov	2	2	2	2	2	2
7.4.6	Profil bazalnega lista	1	1	3	3	3	3
7.4.7	Rob bazalnega lista	1	1	1	1	1	1
7.4.8	Zareze bazalnega lista	0	0	0	0	0	0

se nadaljuje

nadaljevanje

Št. deskriptorja*	Deskriptor\Populacija	MK1	MK2	MK3	MK4	MK5	MK6
7.4.9	Dolžina bazalnega lista (cm)	4,3	4,7	4,7	5,2	5,0	5,0
7.4.10	Širina bazalnega lista (cm)	2,5	2,5	2,5	2,6	2,6	2,7
7.4.11	Dolžina srednjega lista (cm)	8,4	8,2	8,0	8,9	8,0	8,1
7.4.12	Širina srednjega lista (cm)	4,6	4,3	3,9	4,3	4,3	3,9
7.4.13	Dolžina vrhnjega lista (cm)	3,5	3,0	2,9	3,2	3,0	2,8
7.4.14	Širina vrhnjega lista (cm)	0,6	0,5	0,6	0,7	0,6	0,6
7.4.16	Kot rasti listov na steblo	2	2	2	2	2	1
7.4.17	Dolžina peclja bazalnega lista (cm)	2,7	2,1	2,2	2,3	2,3	2,6
7.4.18	Dolžina peclja srednjega lista (cm)	3,7	3,1	2,8	2,4	3,1	2,8
7.4.19	Dolžina peclja vrhnjega lista (cm)	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3
7.4.20	Barva peclja	1	1	1	2	1	1
7.4.21	Dlakavost peclja	5	3	3	3	3	3
7.4.22	Oblika dlak	3	3	2	1	2	1
7.5.3	Št. cvetov na zalistni brst	1	1	1	1	1	1
7.5.6	Št. nodijev do prvega cveta	4,5	4,2	4,5	4	4,1	4
7.5.8	Barva čašnih listov	1	1	1	1	1	1
7.5.10	Dlakavost čašnih listov	7	5	3	5	3	3
7.5.11	Oblika dlak	2	2	2	1	1	1
7.5.12	Dlakavost venčnih listov	7	7	7	7	7	7
7.5.13	Oblika dlak	2	2	2	2	2	3
7.5.14	Barva zunanosti cvetne krone	2	2	2	2	2	2
7.5.15	Barva notranosti cvetne krone	1	2	2	2	2	1
7.5.16	Pigmentacija notranosti cvetne krone	0	1	1	1	1	0
7.5.17	Barva spodnje cvetne ustnice	0	0	0	0	0	0
7.5.20	Barva prašnične niti	1	1	1	1	1	1
7.5.22	Dolžina vratu pestiča	2	2	2	2	2	2

se nadaljuje

nadaljevanje

Št. deskriptorja*	Deskriptor\Populacija	MK7	MK8	MK9	MK10	MK13	BG1
7.2.1	Tip rasti	1	1	1	1	1	1
7.2.2	Oblika rasti	3	3	3	3	3	3
7.2.3	Koreninski sistem	2	2	2	2	2	2
7.3.1	Višina rastline (cm)	40,6	39,3	35,9	39,4	38,1	40,2
7.3.2	Barva stebila	1	1	1	1	1	1
7.3.3	Dlakavost stebila	5	3	5	7	5	7
7.3.4	Oblika dlak	2	2	3	3	2	3
7.3.5	Oblika stebila v prerezu	2	2	2	2	2	2
7.3.6	Stebelna fasciacija	1	1	1	1	1	1
7.3.7	Vejanje stebila	1	1	1	1	1	1
7.3.8	Vzorec vejanja	2	2	2	2	2	2
7.3.9 prvi	Dolžina internodijev (cm)	8,4	8,3	7,3	7,9	7,4	11,6
7.3.9 drugi	Dolžina internodijev (cm)	8,7	8,6	7,6	8,2	7,0	6,9
7.3.9 tretji	Dolžina internodijev (cm)	8,9	9,0	7,0	7,0	7,2	5,2
7.3.9 četrti	Dolžina internodijev (cm)	6,9	7,4	5,2	6,7	7,1	5,4
7.3.9 peti	Dolžina internodijev (cm)	5,9	6,4	5,2	5,7	5,3	4,9
7.4.1	Barva listov	1	1	1	2	1	1
7.4.2	Dlakavost listov	3	3	3	3	0	5
7.4.3	Oblika dlak	1	1	1	1		2
7.4.4	Razporeditev listov	1	1	1	1	1	1
7.4.5 bazalni	Oblika listov	4	3	3	3	4	4
7.4.5 vrhnji	Oblika listov	2	2	2	2	2	2
7.4.6	Profil bazalnega lista	3	3	1	1	1	3
7.4.7	Rob bazalnega lista	1	1	1	1	1	1
7.4.8	Zareze bazalnega lista	0	0	0	0	0	0
7.4.9	Dolžina bazalnega lista (cm)	4,8	4,5	4,5	5,0	4,9	4,8

se nadaljuje

nadaljevanje

Št. deskriptorja*	Deskriptor\Populacija	MK7	MK8	MK9	MK10	MK13	BG1
7.4.10	Širina bazalnega lista (cm)	2,4	2,3	2,3	2,4	2,6	2,7
7.4.11	Dolžina srednjega lista (cm)	7,9	8,1	7,4	7,7	7,6	8,4
7.4.12	Širina srednjega lista (cm)	3,6	4,2	4,2	4,2	3,9	5,4
7.4.13	Dolžina vrhnjega lista (cm)	2,7	2,7	2,6	2,6	2,5	2,7
7.4.14	Širina vrhnjega lista (cm)	0,5	0,5	0,7	0,6	0,5	0,7
7.4.16	Kot rasti listov na steblo	1	1	2	2	2	2
7.4.17	Dolžina peclja bazalnega lista (cm)	2,1	2,3	2,2	2,3	2,6	2,6
7.4.18	Dolžina peclja srednjega lista (cm)	2,4	2,7	2,5	2,5	2,8	2,7
7.4.19	Dolžina peclja vrhnjega lista (cm)	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
7.4.20	Barva peclja	2	2	2	1	2	1
7.4.21	Dlakavost peclja	3	3	5	7	5	7
7.4.22	Oblika dlak	2	1	2	2	1	3
7.5.3	Št. cvetov na zalistni brst	1	1	1	1	1	1
7.5.6	Št. nodijev do prvega cveta	4	4,1	4	5	4,1	4,1
7.5.8	Barva čašnih listov	1	1	1	1	1	1
7.5.10	Dlakavost čašnih listov	3	3	5	7	5	7
7.5.11	Oblika dlak	1	1	1	2	2	3
7.5.12	Dlakavost venčnih listov	7	7	7	7	7	7
7.5.13	Oblika dlak	2	2	2	2	2	3
7.5.14	Barva zunanosti cvetne krone	2	2	2	4	3	1
7.5.15	Barva notranosti cvetne krone	2	2	1	4	2	1
7.5.16	Pigmentacija notranosti cvetne krone	1	1	0	2	1	0
7.5.17	Barva spodnje cvetne ustnice	0	0	0	1	0	0
7.5.20	Barva prašnične niti	1	1	1	1	1	1
7.5.22	Dolžina vratu pestiča	2	2	2	2	2	2

se nadaljuje

nadaljevanje

Št. deskriptorja*	Deskriptor\Populacija	BG2	BG3	ET1	ET2	ET3	ET4
7.2.1	Tip rasti	1	1	1	1	1	1
7.2.2	Oblika rasti	3	3	3	3	3	3
7.2.3	Koreninski sistem	2	2	2	2	2	2
7.3.1	Višina rastline (cm)	42,8	48,1				
7.3.2	Barva stebila	1	1	1	1	1	1
7.3.3	Dlakavost stebila	7	7	3	3	3	3
7.3.4	Oblika dlak	3	3	2	1	2	2
7.3.5	Oblika stebila v prerezu	2	2	2	2	2	2
7.3.6	Stebelna fasciacija	1	1	1	1	1	1
7.3.7	Vejanje stebila	1	1	1	1	1	1
7.3.8	Vzorec vejanja	2	2	2	2	2	2
7.3.9 prvi	Dolžina internodijev (cm)	8,9	9,3	7,4	7,0	6,7	6,0
7.3.9 drugi	Dolžina internodijev (cm)	6,8	9,6	7,7	8,4	7,5	9,3
7.3.9 tretji	Dolžina internodijev (cm)	5,3	6,9	8,2	6,1	7,1	7,5
7.3.9 četrti	Dolžina internodijev (cm)	6,9	8,1	7,4	6,6	6,5	6,5
7.3.9 peti	Dolžina internodijev (cm)	7,2	7,1	6,9	6,2	6,8	8,2
7.4.1	Barva listov	1	1	2	2	1	1
7.4.2	Dlakavost listov	7	5	0	0	3	3
7.4.3	Oblika dlak	2	2			1	1
7.4.4	Razporeditev listov	1	1	1	1	1	1
7.4.5 bazalni	Oblika listov	4	3	4	4	4	4
7.4.5 vrhnji	Oblika listov	2	2	2	2	2	2
7.4.6	Profil bazalnega lista	3	3	3	3	1	3
7.4.7	Rob bazalnega lista	1	1	1	1	1	1
7.4.8	Zareze bazalnega lista	0	0	0	0	0	0
7.4.9	Dolžina bazalnega lista (cm)	4,7	4,7	4,6	4,7	4,3	4,2
7.4.10	Širina bazalnega lista (cm)	2,7	2,8	2,6	2,6	2,3	2,2

se nadaljuje

nadaljevanje

Št. deskriptorja*	Deskriptor\Populacija	BG2	BG3	ET1	ET2	ET3	ET4
7.4.11	Dolžina srednjega lista (cm)	8,5	8,9	8,8	8,4	7,1	7,3
7.4.12	Širina srednjega lista (cm)	5,1	5,1	4,7	4,3	4,0	4,1
7.4.13	Dolžina vrhnjega lista (cm)	2,9	3,0	2,9	2,8	3,1	3,2
7.4.14	Širina vrhnjega lista (cm)	0,6	0,7	0,7	0,6	0,5	0,6
7.4.16	Kot rasti listov na steblo	2	2	2	2	2	2
7.4.17	Dolžina peclja bazalnega lista (cm)	2,8	2,9	2,3	2,4	2,1	2,0
7.4.18	Dolžina peclja srednjega lista (cm)	3,7	4,0	3,7	3,2	2,5	3,2
7.4.19	Dolžina peclja vrhnjega lista (cm)	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3
7.4.20	Barva peclja	1	1	1	2	2	2
7.4.21	Dlakavost peclja	7	7	3	3	3	3
7.4.22	Oblika dlak	3	3	2	2	1	1
7.5.3	Št. cvetov na zalistni brst	1	1				1
7.5.6	Št. nodijev do prvega cveta	4,3	4,4				5,5
7.5.8	Barva čašnih listov	1	1	1	1	1	1
7.5.10	Dlakavost čašnih listov	7	7	5	5	5	3
7.5.11	Oblika dlak	3	3	2	2	2	1
7.5.12	Dlakavost venčnih listov	7	7	7	7	7	5
7.5.13	Oblika dlak	3	3	2	2	2	2
7.5.14	Barva zunanosti cvetne krone	3	2				2
7.5.15	Barva notranosti cvetne krone	3	1				2
7.5.16	Pigmentacija notranosti cvetne krone	2	0				1
7.5.17	Barva spodnje cvetne ustnice	1	0				0
7.5.20	Barva prašnične niti	1	1				1
7.5.22	Dolžina vratu pestiča	2	2				2

se nadaljuje

nadaljevanje

Št. deskriptorja*	Deskriptor\Populacija	ET5	ET6	ET7	ET8	ET9	ET10
7.2.1	Tip rasti	1	1	1	1	1	1
7.2.2	Oblika rasti	3	3	3	3	3	3
7.2.3	Koreninski sistem	2	2	2	2	2	2
7.3.1	Višina rastline (cm)	57,2	57,4				
7.3.2	Barva stebila	1	1	1	1	1	1
7.3.3	Dlakavost stebila	3	3	5	3	3	3
7.3.4	Oblika dlak	2	1	2	1	1	1
7.3.5	Oblika stebila v prerezu	2	2	2	2	2	2
7.3.6	Stebelna fasciacija	1	1	1	1	1	1
7.3.7	Vejanje stebila	1	1	1	1	1	1
7.3.8	Vzorec vejanja	2	2	2	2	2	2
7.3.9 prvi	Dolžina internodijev (cm)	7,8	7,2	8,4	6,7	4,6	5,1
7.3.9 drugi	Dolžina internodijev (cm)	10,6	9,1	7,7	7,8	9,1	8,1
7.3.9 tretji	Dolžina internodijev (cm)	9,5	8,7	9,0	10,3	10,6	8,7
7.3.9 četrti	Dolžina internodijev (cm)	9,9	8,2	8,8	9,5	10,3	7,9
7.3.9 peti	Dolžina internodijev (cm)	8,3	8,2	7,7	6,0	8,2	6,7
7.4.1	Barva listov	1	1	1	1	1	1
7.4.2	Dlakavost listov	3	3	3	0	0	0
7.4.3	Oblika dlak	1	1	1			
7.4.4	Razporeditev listov	1	1	1	1	1	1
7.4.5 bazalni	Oblika listov	4	4	4	3	4	4
7.4.5 vrhnji	Oblika listov	2	2	2	2	2	2
7.4.6	Profil bazalnega lista	3	3	3	2	3	3
7.4.7	Rob bazalnega lista	1	1	1	1	1	1
7.4.8	Zareze bazalnega lista	0	0	0	0	0	0
7.4.9	Dolžina bazalnega lista (cm)	4,2	4,9	4,8	4,9	5,0	4,8

se nadaljuje

nadaljevanje

Št. deskriptorja*	Deskriptor\Populacija	ET5	ET6	ET7	ET8	ET9	ET10
7.4.10	Širina bazalnega lista (cm)	2,3	2,7	2,4	2,5	2,6	2,5
7.4.11	Dolžina srednjega lista (cm)	7,1	7,6	7,9	10,0	9,3	8,7
7.4.12	Širina srednjega lista (cm)	3,8	4,6	4,0	4,3	5,3	5,3
7.4.13	Dolžina vrhnjega lista (cm)	3,2	3,1	3,0	3,2	3,2	3,1
7.4.14	Širina vrhnjega lista (cm)	0,5	0,6	0,6	0,7	1,0	0,8
7.4.16	Kot rasti listov na steblo	2	2	2	2	2	2
7.4.17	Dolžina peclja bazalnega lista (cm)	2,8	2,5	2,5	3,1	3,1	3,0
7.4.18	Dolžina peclja srednjega lista (cm)	3,5	5,3	3,4	4,6	5,1	4,6
7.4.19	Dolžina peclja vrhnjega lista (cm)	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4
7.4.20	Barva peclja	2	2	2	1	2	2
7.4.21	Dlakavost peclja	3	3	5	3	3	3
7.4.22	Oblika dlak	1	1	2	2	2	2
7.5.3	Št. cvetov na zalistni brst	1	1				
7.5.6	Št. nodijev do prvega cveta	6,5	6				
7.5.8	Barva čašnih listov	1	1	1	1	1	1
7.5.10	Dlakavost čašnih listov	7	3				
7.5.11	Oblika dlak	2	1				
7.5.12	Dlakavost venčnih listov	7	7				
7.5.13	Oblika dlak	2	2				
7.5.14	Barva zunanosti cvetne krone	2	2				
7.5.15	Barva notranosti cvetne krone	2	3				
7.5.16	Pigmentacija notranosti cvetne krone	1	2				
7.5.17	Barva spodnje cvetne ustnice	0	1				
7.5.20	Barva prašnične niti	1	1				
7.5.22	Dolžina vratu pestiča	2	2				

se nadaljuje

nadaljevanje

Št. deskriptorja*	Deskriptor\Populacija	ET11	ET12	ET13	ET14	ET15	ET16
7.2.1	Tip rasti	1	1	1	1	1	1
7.2.2	Oblika rasti	3	3	3	3	3	3
7.2.3	Koreninski sistem	2	2	2	2	2	2
7.3.1	Višina rastline (cm)	51,3					
7.3.2	Barva stebila	1	1	1	1	1	1
7.3.3	Dlakavost stebila	5	3	3	3	3	3
7.3.4	Oblika dlak	3	2	2	2	3	1
7.3.5	Oblika stebila v prerezu	2	2	2	2	2	2
7.3.6	Stebelna fasciacija	1	1	1	1	1	1
7.3.7	Vejanje stebila	1	1	1	1	1	1
7.3.8	Vzorec vejanja	2	2	2	2	2	2
7.3.9 prvi	Dolžina internodijev (cm)	4,7	5,8	7,2	4,5	6,8	6,8
7.3.9 drugi	Dolžina internodijev (cm)	9,0	8,5	10,7	9,0	7,3	9,8
7.3.9 tretji	Dolžina internodijev (cm)	6,8	8,5	11,3	8,8	10,5	7,7
7.3.9 četrti	Dolžina internodijev (cm)	6,1	7,8	10,5	9,3	9,8	7,7
7.3.9 peti	Dolžina internodijev (cm)	6,7	7,9	7,2	7,7	7,7	5,7
7.4.1	Barva listov	1	1	1	1	4	4
7.4.2	Dlakavost listov	3	3	3	3	3	3
7.4.3	Oblika dlak	1	1	1	1	1	1
7.4.4	Razporeditev listov	1	1	1	1	1	1
7.4.5 bazalni	Oblika listov	4	4	4	4	4	4
7.4.5 vrhnji	Oblika listov	2	2	2	2	2	2
7.4.6	Profil bazalnega lista	1	3	1	1	3	3
7.4.7	Rob bazalnega lista	1	1	1	1	1	1
7.4.8	Zareze bazalnega lista	0	0	0	0	0	0
7.4.9	Dolžina bazalnega lista (cm)	4,4	4,4	5,4	5,2	4,8	4,7
7.4.10	Širina bazalnega lista (cm)	2,4	2,4	2,7	2,8	2,5	2,4

se nadaljuje

nadaljevanje

Št. deskriptorja*	Deskriptor\Populacija	ET11	ET12	ET13	ET14	ET15	ET16
7.4.11	Dolžina srednjega lista (cm)	8,5	6,5	8,8	9,5	10,1	7,0
7.4.12	Širina srednjega lista (cm)	4,6	4,0	5,0	5,5	5,1	4,1
7.4.13	Dolžina vrhnjega lista (cm)	3,0	3,2	2,9	2,8	3,0	2,7
7.4.14	Širina vrhnjega lista (cm)	0,6	0,6	0,8	0,8	0,6	0,6
7.4.16	Kot rasti listov na steblo	2	2	2	2	2	2
7.4.17	Dolžina peclja bazalnega lista (cm)	2,6	2,0	2,9	2,8	2,9	2,1
7.4.18	Dolžina peclja srednjega lista (cm)	4,6	3,4	4,3	4,7	5,0	2,5
7.4.19	Dolžina peclja vrhnjega lista (cm)	0,4	0,2	0,4	0,4	0,3	0,3
7.4.20	Barva peclja	2	2	2	2	3	1
7.4.21	Dlakavost peclja	5	3	5	5	3	5
7.4.22	Oblika dlak	2	2	2	2	1	2
7.5.3	Št. cvetov na zalistni brst		1				
7.5.6	Št. nodijev do prvega cveta		6				
7.5.8	Barva čašnih listov	1	1	1	1	1	1
7.5.10	Dlakavost čašnih listov		5				
7.5.11	Oblika dlak		2				
7.5.12	Dlakavost venčnih listov		7				
7.5.13	Oblika dlak		2				
7.5.14	Barva zunanosti cvetne krone		2				
7.5.15	Barva notranosti cvetne krone		2				
7.5.16	Pigmentacija notranosti cvetne krone		1				
7.5.17	Barva spodnje cvetne ustnice		0				
7.5.20	Barva prašnične niti		1				
7.5.22	Dolžina vratu pestiča		2				

se nadaljuje

nadaljevanje

Št. deskriptorja*	Deskriptor\Populacija	NN	BG4	BG5	BG6	TR1	TR2
7.2.1	Tip rasti	1	1	1	1	1	1
7.2.2	Oblika rasti	3	3	3	3	3	3
7.2.3	Koreninski sistem	2	2	2	2	2	2
7.3.1	Višina rastline (cm)					47,1	44,5
7.3.2	Barva stebila	1	1	1	1	1	1
7.3.3	Dlakavost stebila	3	3	3	3	5	3
7.3.4	Oblika dlak	2	2	2	2	3	2
7.3.5	Oblika stebila v prerezu	2	2	2	2	2	2
7.3.6	Stebelna fasciacija	1	1	1	1	1	1
7.3.7	Vejanje stebila	1	1	1	1	1	1
7.3.8	Vzorec vejanja	2	2	2	2	2	2
7.3.9 prvi	Dolžina internodijev (cm)	6,7	5,5	4,7	5,7	6,7	8,5
7.3.9 drugi	Dolžina internodijev (cm)	8,8	9,0	8,8	9,5	7,8	8,3
7.3.9 tretji	Dolžina internodijev (cm)	12,8	8,8	7,0	9,3	10,5	9,3
7.3.9 četrti	Dolžina internodijev (cm)	11,0	9,5	6,8	8,8	9,8	9,3
7.3.9 peti	Dolžina internodijev (cm)	7,3	7,0	7,8	7,5	7,5	7,7
7.4.1	Barva listov	4	1	1	1	1	1
7.4.2	Dlakavost listov	3	0	3	3	5	3
7.4.3	Oblika dlak	1		1	1	1	1
7.4.4	Razporeditev listov	1	1	1	1	1	1
7.4.5 bazalni	Oblika listov	4	4	4	4	3	4
7.4.5 vrhnji	Oblika listov	2	2	2	2	2	2
7.4.6	Profil bazalnega lista	2	3	3	1	1	2
7.4.7	Rob bazalnega lista	1	1	1	1	1	1
7.4.8	Zareze bazalnega lista	0	0	0	0	0	0
7.4.9	Dolžina bazalnega lista (cm)	5,3	5,1	4,9	5,0	4,9	4,7

se nadaljuje

nadaljevanje

Št. deskriptorja*	Deskriptor\Populacija	NN	BG4	BG5	BG6	TR1	TR2
7.4.10	Širina bazalnega lista (cm)	2,7	2,4	2,5	2,6	2,4	2,3
7.4.11	Dolžina srednjega lista (cm)	9,3	8,3	9,4	7,5	7,9	7,8
7.4.12	Širina srednjega lista (cm)	4,6	4,7	5,7	4,6	4,0	4,3
7.4.13	Dolžina vrhnjega lista (cm)	3,0	2,7	2,6	2,6	3,1	3,3
7.4.14	Širina vrhnjega lista (cm)	0,8	0,7	0,8	0,7	0,7	0,5
7.4.16	Kot rasti listov na steblo	2	2	2	2	2	2
7.4.17	Dolžina peclja bazalnega lista (cm)	2,5	2,5	2,6	2,8	2,6	2,2
7.4.18	Dolžina peclja srednjega lista (cm)	3,6	4,1	4,5	3,8	3,0	2,9
7.4.19	Dolžina peclja vrhnjega lista (cm)	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3
7.4.20	Barva peclja	2	2	2	2	2	2
7.4.21	Dlakavost peclja	3	3	5	5	5	5
7.4.22	Oblika dlak	2	1	2	2	2	1
7.5.3	Št. cvetov na zalistni brst					1	1
7.5.6	Št. nodijev do prvega cveta					4,9	4,7
7.5.8	Barva čašnih listov	1	1	1	1	1	1
7.5.10	Dlakavost čašnih listov					5	3
7.5.11	Oblika dlak					2	1
7.5.12	Dlakavost venčnih listov					7	5
7.5.13	Oblika dlak					3	2
7.5.14	Barva zunanosti cvetne krone					2	2
7.5.15	Barva notranosti cvetne krone					2	2
7.5.16	Pigmentacija notranosti cvetne krone					1	1
7.5.17	Barva spodnje cvetne ustnice					0	0
7.5.20	Barva prašnične niti					1	1
7.5.22	Dolžina vratu pestiča					2	2

se nadaljuje

nadaljevanje

Št. deskriptorja*	Deskriptor\Populacija	TR3	TR	SY	SD	IN	AFR
7.2.1	Tip rasti	1	1	1	1	1	1
7.2.2	Oblika rasti	3	3	3	3	2	3
7.2.3	Koreninski sistem	2	2	2	2	2	2
7.3.1	Višina rastline (cm)	37,1	52,6	57,8	50,1		
7.3.2	Barva stebila	1	1	1	1	1	1
7.3.3	Dlakavost stebila	5	7	7	5	7	5
7.3.4	Oblika dlak	2	3	3	2	3	2
7.3.5	Oblika stebila v prerezu	2	2	2	2	2	2
7.3.6	Stebelna fasciacija	1	1	1	1	1	1
7.3.7	Vejanje stebila	1	1	1	1	1	1
7.3.8	Vzorec vejanja	2	2	2	2	2	2
7.3.9 prvi	Dolžina internodijev (cm)	6,6	9,0	8,7	11,2	8,7	7,5
7.3.9 drugi	Dolžina internodijev (cm)	5,5	7,7	7,2	7,1	6,1	5,6
7.3.9 tretji	Dolžina internodijev (cm)	5,8	7,7	5,8	7,1	5,1	5,4
7.3.9 četrti	Dolžina internodijev (cm)	6,2	8,0	8,3	9,1	9,4	6,2
7.3.9 peti	Dolžina internodijev (cm)	5,8	6,8	9,0	6,7	5,8	5,6
7.4.1	Barva listov	1	1	1	1	1	1
7.4.2	Dlakavost listov	5	5	5	5	3	3
7.4.3	Oblika dlak	2	2	2	1	1	1
7.4.4	Razporeditev listov	1	1	1	1	1	1
7.4.5 bazalni	Oblika listov	3	4	4	4	4	4
7.4.5 vrhnji	Oblika listov	2	2	2	2	2	2
7.4.6	Profil bazalnega lista	1	1	1	1	3	1
7.4.7	Rob bazalnega lista	1	1	1	1	1	1
7.4.8	Zareze bazalnega lista	0	0	0	0	0	0
7.4.9	Dolžina bazalnega lista (cm)	4,8	4,9	4,9	4,6	4,4	4,5

se nadaljuje

nadaljevanje

Št. deskriptorja*	Deskriptor\Populacija	TR3	TR	SY	SD	IN	AFR
7.4.10	Širina bazalnega lista (cm)	2,1	2,5	2,6	2,6	2,4	2,3
7.4.11	Dolžina srednjega lista (cm)	7,1	9,7	9,6	8,1	7,1	8,2
7.4.12	Širina srednjega lista (cm)	3,5	5,1	5,4	4,8	3,9	4,7
7.4.13	Dolžina vrhnjega lista (cm)	2,9	3,0	3,0	2,7	3,2	2,9
7.4.14	Širina vrhnjega lista (cm)	0,6	0,6	0,5	0,7	0,9	0,7
7.4.16	Kot rasti listov na steblo	2	2	2	2	2	2
7.4.17	Dolžina peclja bazalnega lista (cm)	2,3	2,5	2,9	2,7	2,6	2,6
7.4.18	Dolžina peclja srednjega lista (cm)	2,5	3,8	5,2	3,5	3,4	3,6
7.4.19	Dolžina peclja vrhnjega lista (cm)	0,3	0,3	0,4	0,4	0,3	0,3
7.4.20	Barva peclja	2	2	2	2	1	2
7.4.21	Dlakavost peclja	5	7	7	7	7	7
7.4.22	Oblika dlak	2	3	3	3	3	2
7.5.3	Št. cvetov na zalistni brst	1	1	1	1		
7.5.6	Št. nodijev do prvega cveta	4	5,8	6,5	5		
7.5.8	Barva čašnih listov	1	1	1	1	1	1
7.5.10	Dlakavost čašnih listov	7	7	7	7		
7.5.11	Oblika dlak	2	2	2	1		
7.5.12	Dlakavost venčnih listov	7	7	7	5		
7.5.13	Oblika dlak	3	3	2	2		
7.5.14	Barva zunanosti cvetne krone	1	2	2	3		
7.5.15	Barva notranosti cvetne krone	1	2	2	2		
7.5.16	Pigmentacija notranosti cvetne krone	0	2	2	2		
7.5.17	Barva spodnje cvetne ustnice	0	1	1	1		
7.5.20	Barva prašnične niti	1	1	1	1		
7.5.22	Dolžina vratu pestiča	2	2	2	2		

se nadaljuje

nadaljevanje

Št. deskriptorja*	Deskriptor\Populacija	CN	KR	JP	RU1	RU2	RU3
7.2.1	Tip rasti	1	1	1	1	1	1
7.2.2	Oblika rasti	3	3	3	3	3	3
7.2.3	Koreninski sistem	2	2	2	2	2	2
7.3.1	Višina rastline (cm)				45,7	47,4	43,4
7.3.2	Barva stebila	1	1	1	1	1	1
7.3.3	Dlakavost stebila	5	7	7	5	7	5
7.3.4	Oblika dlak	2	3	3	2	3	3
7.3.5	Oblika stebila v prerezu	2	2	2	2	2	2
7.3.6	Stebelna fasciacija	1	1	1	1	1	1
7.3.7	Vejanje stebila	1	1	1	1	1	1
7.3.8	Vzorec vejanja	2	2	2	2	2	2
7.3.9 prvi	Dolžina internodijev (cm)	7,5	10,0	7,5	9,6	10,4	12,6
7.3.9 drugi	Dolžina internodijev (cm)	8,0	6,9	5,8	7,0	6,8	9,3
7.3.9 tretji	Dolžina internodijev (cm)	8,3	5,0	4,5	4,9	5,7	5,0
7.3.9 četrti	Dolžina internodijev (cm)	7,4	4,9	4,7	6,1	4,4	5,1
7.3.9 peti	Dolžina internodijev (cm)	5,5	4,8	6,0	5,0	4,8	4,6
7.4.1	Barva listov	1	1	1	1	1	1
7.4.2	Dlakavost listov	3	5	5	5	5	7
7.4.3	Oblika dlak	1	2	2	2	2	3
7.4.4	Razporeditev listov	1	1	1	1	1	1
7.4.5 bazalni	Oblika listov	4	4	3	4	4	3
7.4.5 vrhnji	Oblika listov	2	2	2	2	2	2
7.4.6	Profil bazalnega lista	2	1	3	1	1	2
7.4.7	Rob bazalnega lista	1	1	1	1	1	1
7.4.8	Zareze bazalnega lista	0	0	0	0	0	0
7.4.9	Dolžina bazalnega lista (cm)	5,3	5,1	4,8	4,9	4,8	4,9

se nadaljuje

nadaljevanje

Št. deskriptorja*	Deskriptor\Populacija	CN	KR	JP	RU1	RU2	RU3
7.4.10	Širina bazalnega lista (cm)	2,3	2,4	2,0	2,4	2,3	2,5
7.4.11	Dolžina srednjega lista (cm)	8,7	8,3	6,9	9,2	7,8	7,9
7.4.12	Širina srednjega lista (cm)	5,1	4,8	3,5	5,1	4,7	4,7
7.4.13	Dolžina vrhnjega lista (cm)	3,1	2,9	2,8	2,7	2,9	2,4
7.4.14	Širina vrhnjega lista (cm)	0,5	0,6	0,6	0,5	0,6	0,6
7.4.16	Kot rasti listov na steblo	2	2	2	2	2	2
7.4.17	Dolžina peclja bazalnega lista (cm)	3,0	2,9	2,0	2,0	2,0	2,4
7.4.18	Dolžina peclja srednjega lista (cm)	5,0	3,6	2,4	3,1	3,5	3,7
7.4.19	Dolžina peclja vrhnjega lista (cm)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4
7.4.20	Barva peclja	2	1	1	2	2	1
7.4.21	Dlakavost peclja	5	7	7	7	7	7
7.4.22	Oblika dlak	2	3	3	2	3	3
7.5.3	Št. cvetov na zalistni brst			1	1	1	1
7.5.6	Št. nodijev do prvega cveta			5	3,6	3,7	3,1
7.5.8	Barva čašnih listov	1	1	1	1	1	1
7.5.10	Dlakavost čašnih listov			7	7	7	7
7.5.11	Oblika dlak			3	3	1	1
7.5.12	Dlakavost venčnih listov			7	7	7	7
7.5.13	Oblika dlak			3	3	3	3
7.5.14	Barva zunanosti cvetne krone			2	3	3	2
7.5.15	Barva notranosti cvetne krone			2	3	3	2
7.5.16	Pigmentacija notranosti cvetne krone			1	2	2	1
7.5.17	Barva spodnje cvetne ustnice			0	1	1	0
7.5.20	Barva prašnične niti			1	1	1	1
7.5.22	Dolžina vratu pestiča			2	2	2	2

se nadaljuje

nadaljevanje

Št. deskriptorja*	Deskriptor\Populacija	UA1	MK11	MK12
7.2.1	Tip rasti	1	1	1
7.2.2	Oblika rasti	3	3	3
7.2.3	Koreninski sistem	2	2	2
7.3.1	Višina rastline (cm)	41,8	39,1	36,8
7.3.2	Barva stebila	1	1	1
7.3.3	Dlakavost stebila	7	5	5
7.3.4	Oblika dlak	2	2	2
7.3.5	Oblika stebila v prerezu	2	2	2
7.3.6	Stebelna fasciacija	1	1	1
7.3.7	Vejanje stebila	1	1	1
7.3.8	Vzorec vejanja	2	2	2
7.3.9 prvi	Dolžina internodijev (cm)	10,7	7,8	7,1
7.3.9 drugi	Dolžina internodijev (cm)	7,5	6,9	6,9
7.3.9 tretji	Dolžina internodijev (cm)	5,9	7,2	6,9
7.3.9 četrti	Dolžina internodijev (cm)	4,8	7,3	7,5
7.3.9 peti	Dolžina internodijev (cm)	4,6	6,8	6,7
7.4.1	Barva listov	1	1	1
7.4.2	Dlakavost listov	5	3	3
7.4.3	Oblika dlak	1	1	1
7.4.4	Razporeditev listov	1	1	1
7.4.5 bazalni	Oblika listov	4	3	3
7.4.5 vrhnji	Oblika listov	2	2	2
7.4.6	Profil bazalnega lista	1	1	1
7.4.7	Rob bazalnega lista	1	1	1
7.4.8	Zareze bazalnega lista	0	0	0
7.4.9	Dolžina bazalnega lista (cm)	4,8	5,6	5,6

se nadaljuje

nadaljevanje

Št. deskriptorja*	Deskriptor\Populacija	UA1	MK11	MK12
7.4.10	Širina bazalnega lista (cm)	2,4	2,6	2,8
7.4.11	Dolžina srednjega lista (cm)	8,4	8,7	8,7
7.4.12	Širina srednjega lista (cm)	4,9	4,2	4,3
7.4.13	Dolžina vrhnjega lista (cm)	2,5	3,3	3,2
7.4.14	Širina vrhnjega lista (cm)	0,6	0,6	0,5
7.4.16	Kot rasti listov na steblo	2	2	2
7.4.17	Dolžina peclja bazalnega lista (cm)	2,4	3,4	3,4
7.4.18	Dolžina peclja srednjega lista (cm)	3,9	4,5	4,2
7.4.19	Dolžina peclja vrhnjega lista (cm)	0,4	0,3	0,3
7.4.20	Barva peclja	1	1	1
7.4.21	Dlakavost peclja	7	3	3
7.4.22	Oblika dlak	3	1	1
7.5.3	Št. cvetov na zalistni brst	1	1	1
7.5.6	Št. nodijev do prvega cveta	4	3,6	3,7
7.5.8	Barva čašnih listov	1	1	1
7.5.10	Dlakavost čašnih listov	7	7	7
7.5.11	Oblika dlak	3	2	2
7.5.12	Dlakavost venčnih listov	7	5	5
7.5.13	Oblika dlak	3	3	3
7.5.14	Barva zunanosti cvetne krone	4	2	2
7.5.15	Barva notranosti cvetne krone	3	2	2
7.5.16	Pigmentacija notranosti cvetne krone	2	1	1
7.5.17	Barva spodnje cvetne ustnice	1	0	0
7.5.20	Barva prašnične niti	1	1	1
7.5.22	Dolžina vratu pestiča	2	2	2

* Številčne oznake deskriptorjev so povzete po Descriptors ... (2004).