

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Alenka ARBEITER

**GENETSKA VARIABILNOST DIVJIH FIG  
(*Ficus carica* L.) VZHODNE JADRANSKE REGIJE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Alenka ARBEITER

**GENETSKA VARIABILNOST DIVJIH FIG (*Ficus carica* L.)  
VZHODNE JADRANSKE REGIJE**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**GENETIC VARIABILITY OF WILD FIGS (*Ficus carica* L.) IN THE  
EASTERN ADRIATIC REGION**

UNDERGRADUATE THESIS  
University Studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Inštitutu za sredozemsko kmetijstvo in oljkarstvo, Znanstveno-raziskovalnega središča Koper Univerze na Primorskem.

Študijska komisija Oddelka za Biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Dunjo Bandelj Mavsar in za recenzenta prof. dr. Petra Trontlja.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Marjanca Starčič Erjavec  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za Biologijo

Član: prof. dr. Peter Trontelj  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za Biologijo

Članica: doc. dr. Dunja Bandelj Mavsar  
Univerza na Primorskem, Znanstveno-raziskovalno središče Koper,  
Inštitut za sredozemsko kmetijstvo in oljkarstvo

Datum zagovora:

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

Alenka Arbeiter

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn  
UDK 575.2.087:582.635.3:577.2.08(043.2)=163.6  
KG *Ficus carica* L./genetska variabilnost/RAPD/mikrosateliti  
AV ARBEITER, Alenka  
SA BANDELJ-MAVSAR, Dunja (mentor)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 111  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo  
LI 2009  
IN Genetska variabilnost divjih fig (*Ficus carica* L.) vzhodne jadranske regije  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
IJ SI  
JI sl/en
- AI Genomsko DNA 40-ih figovih dreves (*Ficus carica* L.) s štirih različnih območij ('slovenska Istra', 'dolina reke Cetine', 'otok Hvar', 'Črna gora') smo izolirali po uveljavljenem protokolu (Kump in sod., 1992). Z 11 začetnimi oligonukleotidi smo namnožili 87 naključnih fragmentov RAPD, od tega 65 polimorfnih (74,4%). Povprečno število namnoženih fragmentov RAPD na začetni oligonukleotid je bilo 7,9, povprečno število polimorfnih pa 5,9. Izbrali smo 10 predhodno objavljenih mikrosatelitskih lokusov (Bandelj in sod., 2007). Namnožili smo 62 polimorfnih alelov s povprečjem 6,2 alela in informacijsko vrednostjo polimorfizma 0,574 na lokus. Najboljše parametre variabilnosti in visoko informacijsko vrednost smo odkrili na lokusih FCUP008, FCUP038 in FCUP068, najslabše pa na lokusih FCUP015, FCUP042 in FCUP062, zaradi nizke informacijske vrednosti polimorfizma in visoke verjetnosti enakosti genotipov ter majhnega števila učinkovitih alelov. Opažena heterozigotnost ( $H_o$ ) je bila najnižja ( $H_o=0,300$ ) na lokusih FCUP015 in FCUP042 ter najvišja ( $H_o=0,950$ ) na lokusu FCUP066. V povprečju sta bili opažena heterozigotnost ( $H_o=0,615$ ) in pričakovana heterozigotnost ( $H_e=0,623$ ) nižji, kot bi pričakovali za divje fige, ki se razmnožujejo s spontanim križanjem. Na osnovi informacijske vrednosti polimorfizma so se med informativne ( $PIC>0,5$ ) uvrstili vsi lokusi, razen FCUP015 in FCUP042. Le lokus FCUP008 je izpolnjeval tudi kriterij o primernosti lokusa za kartiranje ( $PIC>0,7$ ). Z obema molekularnima metodama smo ugotovili raznolikost med vzorčnimi figami in ocenili genetsko podobnost vzorčnih fig z izračuni Jaccardovih koeficientov podobnosti. Razporeditev vzorčnih fig v sorodnostne skupine z metodo UPGMA je bila z obema molekularnima metodama različna. Skupna obema dendrogramoma je bila razvrstitev hrvaških vzorcev, kar kaže na genetsko podobnost in ožji genetski material. V dendrogramu RAPD so se vzorci iz Črne gore razvrstili v samostojno skupino, kar tudi kaže na genetsko podoben rastlinski material. Ugotovili smo, da so RAPD in mikrosateliti primerno orodje za proučevanje genetske raznolikosti divjih fig.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn  
DC 575.2.087:582.635.3:577.2.08(043.2)=163.6  
CX *Ficus carica* L./genetic variability/RAPD/microsatellites  
AU ARBEITER, Alenka  
AA BANDELJ-MAVSAR, Dunja (supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 111  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology  
PY 2009  
TI Genetic Variability of Wild Figs (*Ficus carica* L.) in the Eastern Adriatic Region  
DT Undergraduate Thesis (University Studies)  
LA SI  
AL sl/en
- AB The genomic DNA of forty fig trees (*Ficus carica* L.) from four different regions ('Slovenian Istra', 'Cetina river valley', 'Hvar island', 'Montenegro') was extracted from fresh leaves. 11 arbitrary primers were used for amplification of randomly amplified polymorphic DNA. The total number of amplified bands was 87, and 65 of these were polymorphic (74.4 %). The average number of amplified bands per primer was 7.9, and there was an average of 5.9 polymorphic bands per primer. 10 previously reported microsatellite loci (Bandelj et al., 2007) were selected. 62 polymorphic alleles were amplified over all microsatellite loci with an average of 6.2 alleles and a polymorphic information content of 0.574 per locus. Optimal variability parameters and high information content were discovered at the loci FCUP008, FCUP038 and FCUP068. The lowest polymorphic information content, a high probability of identity and a low number of effective alleles were characteristic of loci the FCUP008, FCUP042 and FCUP062. The lowest observed heterozygosity ( $H_o=0.300$ ) was discovered at the loci FCUP015, FCUP042 and the highest ( $H_o=0.950$ ) at locus FCUP066. The average observed heterozygosity ( $H_o=0.615$ ) and expected ( $H_e=0.623$ ) heterozygosity were lower than would be expected for wild figs which are spontaneous hybrids. On the basis of polymorphic information content, all the microsatellite loci, except FCUP015 and FCUP042, were classified as very informative loci ( $PIC>0.5$ ), and only one locus (FCUP008) was suitable for mapping ( $PIC >0.7$ ). Both molecular methods demonstrated genetic variability in the 40 fig samples. Estimates of genetic similarity were calculated using Jaccard's coefficient of similarity. The clustering of the fig samples analysed on the resulting similarity matrices using the UPGMA method gave fairly dissimilar dendrograms for the microsatellite and RAPD. The Cluster of Croatia fig samples was common to all, indicating their genetic similarity and narrow genetic material. In the RAPD dendrogram, samples from Montenegro demonstrated a specific cluster, also indicating genetically similar plant material. It was determined that microsatellites and RAPD can be useful for analysing the genetic variability of wild figs.

## KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija .....	III
Key words documentation .....	IV
Kazalo vsebine.....	V
Kazalo preglednic .....	VII
Kazalo slik .....	VIII
Kazalo prilog .....	IX
Okrajšave in simboli.....	X
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>2</b>
2.1 FIGA.....	2
<b>2.1.1 Botanična klasifikacija fige.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1.2 Biološke značilnosti fige .....</b>	<b>2</b>
2.1.2.1 Morfologija.....	2
2.1.2.2 Razmnoževanje.....	3
2.1.2.3 Obdobje cvetenja .....	5
2.1.2.4 Dedovanje spola .....	6
<b>2.1.3 Gojene fige.....</b>	<b>7</b>
2.1.3.1 Gojenje fige .....	8
2.1.3.2 Škodljivci in bolezni pri figi.....	8
<b>2.1.4 Hranilne in druge koristne snovi v figah.....</b>	<b>9</b>
2.2 METODE ZA RAZISKOVANJE GENETSKE RAZNOLIKOSTI .....	10
<b>2.2.1 Metoda RAPD .....</b>	<b>11</b>
<b>2.2.2 Mikrosatelitski lokusi .....</b>	<b>12</b>
<b>3 MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>19</b>
3.1 RASTLINSKI MATERIAL .....	19
3.2 IZOLACIJA CELOKUPNE DNA .....	20
3.3 MERJENJE KONCENTRACIJE DNA .....	21
3.4 NAMNOŽEVANJE FRAGMENTOV RAPD .....	21
3.5 NAMNOŽEVANJE MIKROSATELITOV .....	22
3.6 ZAZNAVANJE NAMNOŽENIH FRAGMENTOV RAPD .....	25
3.7 ZAZNAVANJE NAMNOŽENIH MIKROSATELITOV .....	25
3.8 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV .....	26
<b>3.8.1 Vrednotenje namnoženih fragmentov RAPD .....</b>	<b>26</b>
<b>3.8.2 Vrednotenje mikrosatelitov .....</b>	<b>26</b>
<b>3.8.3 Genetska podobnost med posameznimi vzorci .....</b>	<b>26</b>
<b>3.8.4 Korelacijski koeficient (r), testiran z Mantelovo statistiko (Z) .....</b>	<b>27</b>
<b>3.8.5 Parametri, ki opredeljujejo lastnosti mikrosatelitov.....</b>	<b>27</b>
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>30</b>
4.1 ANALIZA NAMNOŽENIH FRAGMENTOV RAPD.....	30
<b>4.1.1 Karakterizacija namnoženih fragmentov RAPD .....</b>	<b>30</b>

4.1.2 Genetska podobnost fig – metoda RAPD .....	32
4.2 ANALIZA MIKROSATELITSKIH LOKUSOV .....	33
4.2.1 Karakterizacija mikrosatelitskih lokusov .....	33
4.2.2 Genetska podobnost fig-mikrosatelitski lokusi.....	39
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>41</b>
5.1 ANALIZA NAMNOŽENIH FRAGMENTOV RAPD.....	41
5.2 ANALIZA MIKROSATELITSKIH LOKUSOV .....	42
5.3 GENETSKA PODOBNOST FIG.....	44
<b>6 POVZETEK.....</b>	<b>47</b>
<b>7 VIRI .....</b>	<b>49</b>

**ZAHVALA**

**PRILOGE**

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b> Seznam uporabljenih začetnih oligonukleotidov .....	22
<b>Preglednica 2:</b> Zaporedje parov začetnih oligonukleotidov analiziranih mikrosatelitskih lokusov in osnovni motiv mikrosatelita .....	23
<b>Preglednica 3:</b> Temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov ter število ciklov namnoževanja .....	24
<b>Preglednica 4:</b> Seznam začetnih oligonukleotidov, število namnoženih in polimorfnih fragmentov RAPD ter odstotek polimorfnih pri 40-ih vzorčnih drevesih fige.....	30
<b>Preglednica 5:</b> Parametri genetske variabilnosti posameznih mikrosatelitskih lokusov 40-ih vzorčnih dreves fige .....	33
<b>Preglednica 6:</b> Opažena ( $H_o$ ) in pričakovana ( $H_e$ ) heterozigotnost ter P-vrednosti, izračunane v eksaktnem testu Hardy-Weinbergovega ravnovesja .....	35
<b>Preglednica 7:</b> Dolžina alelov (bp) in frekvenca alelov (v oklepaju) 40-ih vzorčnih dreves fige na 10 mikrosatelitskih lokusih.....	37
<b>Preglednica 8:</b> Geografsko specifični aleli.....	39



## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Figa, ki je ponovno pognala na pogorišču (Foto: Dunja Bandelj).....	3
<b>Slika 2:</b> Osica šiškarica ( <i>Blastophaga psenes</i> L.) .....	4
<b>Slika 3:</b> Oblike cvetov.....	5
<b>Slika 4:</b> Ženski in moški cvetovi istega sikonija fige (Foto: Maja Podgornik) .....	6
<b>Slika 5:</b> Primarni habitat fige (Foto: Dunja Bandelj).....	7
<b>Slika 6:</b> Sadež gojene fige (Foto: Maja Podgornik).....	8
<b>Slika 7:</b> Simptomi, značilni za mozaični virus fige .....	9
<b>Slika 8:</b> Homoplazija .....	16
<b>Slika 9:</b> Dolina reke Cetine in gorovje Biokovo.....	19
<b>Slika 10:</b> Južna obala otoka Hvara.....	20
<b>Slika 11:</b> Na agaroznem gelu ločeni produkti reakcije PCR z začetnim oligonukleotidom OPA-05 pri 40-ih vzorcih fig.....	31
<b>Slika 12:</b> Na agaroznem gelu ločeni produkti reakcije PCR za začetni oligonukleotid OPX-13 pri 40-ih vzorcih fig.....	31
<b>Slika 13:</b> Dendrogram UPGMA osnovan na podatkih RAPD in izračunu Jaccardovih koeficientov podobnosti 40-ih vzorčnih dreves fige .....	32
<b>Slika 14:</b> Opažena ( $H_o$ ) in pričakovana ( $H_e$ ) heterozigotnost po lokusih .....	34
<b>Slika 15:</b> Elektroforegram mikrosatelitskega lokusa FCUP038 pri vzorcih fig .....	36
<b>Slika 16:</b> Frekvence alelov posameznih lokusov .....	38
<b>Slika 17:</b> Dendrogram UPGMA narejen na osnovi MS podatkov in Jaccardovih koeficientov genetske podobnosti med 40 vzorčnimi drevesi fig .....	40

## KAZALO PRILOG

**PRILOGA A1:** Binarna matrika na osnovi prisotnosti (1) ali odsotnosti (0) določenega namnoženega fragmenta RAPD pri posameznem vzorcu fige

**PRILOGA A2:** Binarna matrika na osnovi prisotnosti (1) ali odsotnosti (0) določenega mikrosatelitskega alela pri posameznem vzorcu fige

**PRILOGA B1:** Jaccardovi koeficienti podobnosti med vzorčnimi drevesi divjih fig z namnoženimi fragmenti RAPD

**PRILOGA B2:** Jaccardovi koeficienti podobnosti med vzorčnimi drevesi divjih fig z mikrosatelitskimi lokusi

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	adenin
angl.	angleško
AFLP	polimorfizem dolžin namnoženih fragmentov
bp	bazni par
C	citozin
CTAB	N-cetil-N, N, N-trimetilamonijev bromid
CY <sub>5</sub>	indopentametincianin fluorescentno barvilo
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EDTA	etilen-diamino-tetraocetna kislina
EST	izražena nukleotidna zaporedja
FMD	»fig mosaic disease«, bolezen fige, ki jo povzroča mozaični virus
G	gvanin
H <sub>e</sub>	pričakovana heterozigotnost
H <sub>o</sub>	opažena heterozigotnost
LDL	lipoproteini nizke gostote
μ	mikro
MMR	sistem za popravljanje neujemanja
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina
n	dejansko število alelov lokusa
n <sub>e</sub>	število efektivnih alelov lokusa
PCR	verižna reakcija s polimerazo
pH	negativni logaritem koncentracije vodikovih protonov
PI	verjetnost enakosti genotipov
P <sub>i</sub>	verjetnost <i>i</i> -tega alela
PIC	informacijska vrednost polimorfizma lokusa
pufer TE	raztopina Tris-a in EDTA
pufer TNE	raztopina Tris-a, NaCl in EDTA
r	korelacijski koeficient
RAPD	naključno namnožena polimorfna DNA
RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov

SCAR	namnoženi fragmenti, določeni z nukleotidnim zaporedjem
SSLP	polimorfizem dolžin enostavnih zaporedij
SSM	model nepravilnega parjenja zdrsnjenih vijačnic med podvojevanjem DNA
SSR	ponovitve enostavnih zaporedij
STR	kratke tandemske ponovitve
T	timidin
<i>Taq</i> polimeraza	DNA-polimeraza <i>Thermus aquaticus</i>
TRIS	trishidroksietilaminometan
UCO	neenako prekrižanje
UPGMA	metoda aritmetičnega povprečja neutežnih parov
VNTR	spremenljivo število tandemskih ponovitev

## 1 UVOD

Figa (*Ficus carica* L.) je subtropska sadna rastlina. Je značilna sadna vrsta Sredozemlja in zmeraj spremlja oljko in trto. Gojili naj bi jo že v bronasti dobi (Zohary in Hopf, 2000). V Sredozemlju je imela bogate simbolne pomene. Pri starih Grkih je bila posvečena Dionizu. Povezovali so jo z vinom in poudarjali njen erotični naboj. V Bibliji pomeni simbol rodovitnosti in je prvič omenjena v zvezi z Adamom in Evo, ki sta se v trenutku spoznanja pokrila z njenimi listi (Brus, 2004). Kljub dolgi zgodovini gojenja in veliki pestrosti sort, je gojena figa v evropskih sredozemskih državah gospodarsko manj pomembna sadna vrsta. Svetovni pridelok gojenih fig ocenjujejo na en milijon ton. Največja pridelovalka gojenih fig je Turčija, ki proizvede približno 26 % svetovne proizvodnje. Preostalih 70 % pa pridelajo v Egiptu, Iranu, Grčiji, Alžiriji in Maroku (Stover in sod., 2007).

Včasih je imela gojena figa večji gospodarski pomen kot danes. Se pa zanimanje zanjo veča, saj je zelo rodno drevo, sadeži pa so privlačni zaradi eksotičnosti, vsebnosti vlaknin in številnih hranilnih snovi z zdravilnimi učinki. Vedno bolj je tudi zanimiva naravi prijazna pridelava, ki je značilna za gojeno figo, saj nima gospodarsko pomembnejših boleznih in škodljivcev (Vrhovnik in Prgomet, 2008).

Informacije o sortah in populacijah fig vzhodne jadranske regije so v literaturi zelo skromne. Osnovane so predvsem na fenotipskih opisih znakov, ki pa zaradi razprostranosti gojenja običajno niso primerljivi. Za figo je značilen zapleten način oploditve. Poznavanje genetske raznolikosti fig širšega območja je nujno potrebno, saj omogoča vpogled v zgodovinsko ozadje domestikacije in uspešno gospodarjenje z genskimi viri.

V zadnjih dvajsetih letih je razvoj molekularnih metod analize DNA omogočil revolucionarni pristop pri proučevanju strukture genoma in genetske raznolikosti pomembnejših kmetijskih rastlin. Napredku molekularne biologije je sledilo tudi sadjarstvo. Molekularne metode se rutinsko uporabljajo za molekularno karakterizacijo in genotipizacijo ter identifikacijo sort in klonov, za proučevanje izvora in sorodnosti sadnih vrst in za iskanje genov, povezanih z gospodarsko pomembnimi lastnostmi (odpornost proti boleznim in škodljivcem ter drugim stresnim dejavnikom, geni, ki vplivajo na kakovost pridelka...) (Bandelj in sod., 2008).

Molekularna karakterizacija fig vzhodne jadranske regije še ni bila opravljena. Zato želimo z zastavljeno nalogo z analizo mikrosatelitov in naključno namnožene polimorfne DNA z metodo RAPD ovrednotiti genetsko raznolikost divjih fig slovenske Istre in Dalmacije in jih medsebojno primerjati. Znani so podatki genotipizacije za gojene sorte fig slovenske in hrvaške Istre. Podatke bomo lahko primerjali z rezultati dobljenimi v naši nalogi in ugotovili ali se na omenjenih območjih divje populacije fig znatno razlikujejo od gojenih fig.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 FIGA

#### 2.1.1 Botanična klasifikacija fige

Figa (*Ficus carica* L.) pripada deblu kritosemenke (*Magnoliophyta*), razredu dvokaličnice (*Magnoliopsida*), redu šipkovci (*Rosales*), družini murvovke (*Moraceae*), rodu smokvovec (*Ficus*) in podrodu *Ficus* (Martinčič, 1984).

Družina *Moraceae* vključuje približno 40 rodov. Predstavniki družine so monoecična ali diecična drevesa ali grmi. Skoraj vsi vsebujejo matični mleček. V rodu *Ficus* je nad 1000 vrst, največ iz tropskih in subtropskih območij, manj pa iz zmernih klimatov. Spontano figa uspeva po celotnem sredozemskem območju. Poleg tega je figa pomemben arborealni element v zmerno vlažnih gozdovih na severu Turčije (pokrajina Colchic), na severu Irana (pokrajina Hyrcania) in v Transkavkaziji. Nekateri avtorji vključujejo te visoke, divje gozdne oblike v *F. carica* L. Drugi, še posebej ruski botaniki, pa jih obravnavajo kot neodvisne vrste (*F. hyrcanica*, Grossh.). Vrste rodu *Ficus* poseljujejo tudi suha območja porasla z grmičevjem: na jugu Irana *F. geraniifolia*, v Afganistanu *F. virgata*, v Egiptu in Sinaju *F. pseudosycomorus* in v Etiopiji *F. palmata* (Zohary in Spiegel-Roy, 1975). Le redke vrste imajo užitne plodove. Užitne plodove ima gojena figa, *Ficus carica* L., ki je pomembna v človeški prehrani (Stover in sod., 2007).

Domnevajo, da je divja oblika fige (*F. carica*) z območja južne Turčije značilen prednik domesticirane fige. Domestikacija se je vršila s selekcijo za večji plod in višjo vsebnost sladkorja. Spremenila je tudi reproduktivno biologijo drevesa. Gojene fige se razmnožujejo nespolno (vegetativno) z ženskimi kloni, da se ohranjajo želene lastnosti fiksirane. Divje oblike in gojene fige niso med sabo reprodukcijsko popolnoma izolirane. Pogosto so rasle vzporedno, zato je bil med njimi mogoč genski pretok, kar se odraža v veliki genetski raznolikosti današnjih fig (Zohary in Spiegel-Roy, 1975).

#### 2.1.2 Biološke značilnosti fige

##### 2.1.2.1 Morfologija

Figa je do 10 m visoko in do 1,5 m debelo listopadno drevo ali grm. Ima široko in redko krošnjo ter dobro razvit, močan koreninski sistem. Skorja na deblu je pepelnato siva in gladka, rastlina pa vsebuje gost mlečni sok. Poganjki so debeli, nekoliko dlakavi in imajo izrazite listne brazgotine. Terminalni brsti so jajčasti in dolgo zašiljeni, lateralni brsti so okroglasti in do 5 mm dolgi. Listi so premenjalno nameščeni in različnih oblik. Običajno so dlanasto deljeni, imajo 3 do 7 izrazitih krp in med njimi globoke zareze. Včasih pa so enostavni, dolgi in široki 10-20 cm. Na zgornji strani so listi usnjati in hrapavi, spodaj

rahlo dlakavi. Cvetovi so enospolni (moški s prašniki, ženski s pestičem ali ženski sterilni) in skriti v mnogoštevilnem socvetju v zaprtem mesnatem cvetišču, ki je po obliki pomanjšana figa. Razvijajo se v treh generacijah: spomladanski, poletni in jesenski. Dozorela figa je hruškaste oblike in je pravzaprav sikonij (soplodje), obdan s sočnim mesnatim ovojem. Posamezni plodovi so drobni, trdi oreški v notranjosti (Brus, 2004). Iz potaknjencev ali semen zrastejo drevesa z enim samim deblom. Drevesa, ki jih je prizadela zmrzal, požar ali pa so propadla zaradi bolezni, pa lahko ponovno poženejo iz korenine (slika 1). V tem primeru nastanejo številna debla (Stover in sod., 2007).



**Slika 1:** Figa, ki je ponovno pognala na pogorišču (Foto: Dunja Bandelj).

#### 2.1.2.2 Razmnoževanje

Figa ima edinstven način razmnoževanja, ki je precej zapleteno in osnovano na :

1. visoko specializiranih cvetovih (sikoniji),
2. prisotnosti dveh spolov; ženska oblika naj bi bila prava figa, moški cvet pa imenujemo kaprifiga,
3. izredno specializiranem mutualizmu med osico šiškaričo in figo (slika 2) (Zohary in Hopf, 2000).

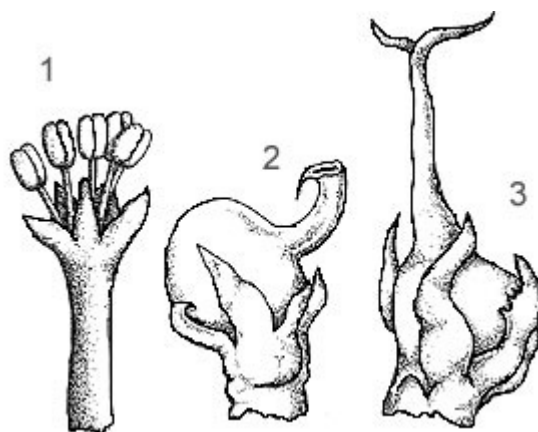


**Slika 2:** Osica šiškariča (*Blastophaga psenes* L.).

([http://www.figweb.org/Fig\\_wasps/Agonidae/Blastophaga/Blastophaga\\_psenes/htm](http://www.figweb.org/Fig_wasps/Agonidae/Blastophaga/Blastophaga_psenes/htm)).

Pri figi je prisoten mehanizem oploditve, pri katerem kot oprashevalka sodeluje majhna osica šiškariča (*Blastophaga psenes* L.). Pri figi poznamo več tipov cvetov. Ločimo divji tip pri divji figi in iz njega izvedene kultivirane vrste. Pri divjem tipu (kozje fige, moške fige, kaprifige) obstoja dvoje vrst cvetov na isti rastlini (monoecičnost): moški cvetovi s prašniki in ženski cvetovi, ki imajo le pestič (slika 3). Oba tipa cvetov se nahajata znotraj sikonija, kot botanično imenujemo mesnato socvetje (soplodje fige). Na vrhu sikonija je odprtina, ob njej pa so nameščeni moški cvetovi, medtem ko so ženski cvetovi nameščeni bolj v notranjosti. Ženski cvetovi so dveh vrst: s kratkim in dolgim vratom pestiča. Na »moških« rastlinah so v prej opisanem sikoniju z moškimi in ženskimi cvetovi le ženski s kratkimi vratovi. Drugi tip ženskega cveta, z dolgim pestičem, pa se nahaja na »ženskih« rastlinah. V tem primeru znotraj sikonijev ni moških cvetov, temveč le ženski cvetovi z dolgim pestičem. Oprashevanje v naravi poteka tako, da se osice razvijejo znotraj ženskih cvetov s kratkim vratom pestiča (na »moških« rastlinah). Ko izletavajo iz sikonija, se posujejo s pelodom z moških cvetov. Nato letijo na sosednja drevesa. Če priletijo na »ženski« sikonij, v njem najdejo le pestiče z dolgimi vratovi, ki jih oprasijo s pelodom, ne morejo pa v njih izleči jajčec. Če pridejo v »moški« sikonij, tam izležejo jajčeca tako, da prodrejo preko vratu pestiča do ovarija in pri tem poškodujejo cvet. Tak ženski cvet ni oplojen, temveč se v njem razvije le endosperm, ki je hrana osicam. Ovarij z osico se razvije v nekakšno miniaturno šiško, ki se razlikuje od tipičnih šišk po tem, da tkivo ni značilno izmaličeno (Bohanec in sod., 2008). Opisan način oprashevanja imenujemo tudi polinacija ali kaprifikacija (Jousselin in sod., 2003).





**Slika 3:** Oblike cvetov.

(1) moški cvet, (2) ženski cvet s kratkim vratom, (3) ženski cvet z dolgim vratom (<http://waynesword.palomar.edu/wayne.htm>).

Glede na način oploditve so fige razdelili na naslednje skupine:

1. **Navadne fige;** so partenokarpne (razvoj plodov brez oploditve in brez semen ali kalčkov v njih) in ne potrebujejo oprašitve (Stover in sod., 2007). Najstarejša najdba partenokarpnih fig izvira iz leta 11.400 pred našim štetjem, kar je prej kot so znane najdbe domestikacije pšenice (Kislev in sod., 2006). Sem spada večina današnjih sort, ki jih uživamo. Te so bile izbrane, ker so sposobne razviti izredno okusne in velike sikonije brez predhodne oprašitve. Partenokarpijo naj bi določala ena sama mutacija, ki naj bi se zgodila v času domestikacije (Zohary in Hopf, 2000).
2. **Šmirna tip;** še vedno potrebuje oprašitev za razvoj plodov.
3. **Kaprifige;** so vir peloda za tiste fige, ki potrebujejo oprašitev za razvoj plodov.

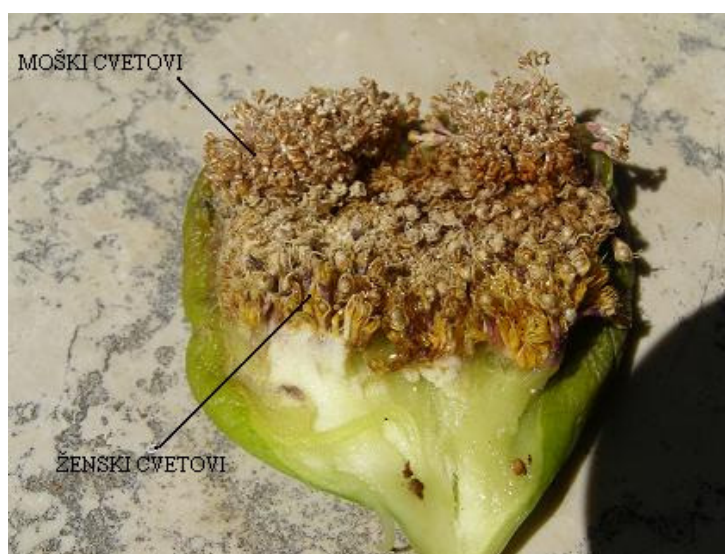
Pridelovalci fig si zelo prizadevajo, da bi v posamezno figo vstopila le ena sama osica. Prekomerna polinacija povečuje razpoke plodov. Hkrati pa osica s svojim vstopom занese v plodove tudi mikroorganizme, ki lahko povzročijo notranje poškodbe tkiva ali bolezni (Stover in sod., 2007).

#### 2.1.2.3 Obdobje cvetenja

Divje fige cvetijo trikrat na leto. To pa ne velja za vse sodobne sorte, ki večinoma cvetijo dvakrat (dvorodne sorte), lahko pa tudi le enkrat (enorodne sorte) na leto. V naravnih populacijah imajo trije rodovi do določene mere različno funkcijo. Jesensko/zimski cvetovi (*mamme*) (3. rod) se razvijejo na mladih poganjkih in v njih položijo osice šiškarice (*Blastophaga psenes* L.) svoja jajčeca. Ta se kmalu razvijejo, a zaradi nizkih temperatur ne izletavajo. V pomladnem času (1. rod) se tvorijo pomladni cvetovi (*profici*), ki jih obletavajo osice iz prezimljenih cvetov. Sikoniji propadejo, če vanje niso prodrle osice in jih navidezno oplodile. Osice, ki se izležejo iz teh cvetov, so najpomembnejše za

opraševanje poletnih cvetov ženskih rastlin (kaprifikacija), kar seveda velja za tiste sorte, ki opraševanje potrebujejo za tvorbo soplodij. Enako velja za poletne cvetove (*mammoni*) (2. rod).

Za cvetove fige je značilna protoginija, ki zmanjšuje verjetnost samooprašitve znotraj sikonija. Obstaja namreč velika razlika v dozorevanju ženskih in moških cvetov istega sikonija (slika 4). Pelod se torej lahko pojavi nekaj mesecev kasneje, kot so dozoreli ženski cvetovi. Pelod se normalno formira le iz pomladanskih cvetov, nastaja pa poleti (Bohanec in sod., 2008). Protoginija je zelo pomembna pridobitev in je rezultat koevolucije med osico in figo (Stover in sod., 2007).



**Slika 4:** Ženski in moški cvetovi istega sikonija fige (Foto: Maja Podgornik).

#### 2.1.2.4 Dedovanje spola

Tvorba »ženskega« cveta s kratkim vratom (na »moški« rastlini) je determinirana s parom dominantnih genov G in A. Gen G določa dolžino vratu (dominantna oblika kratek vrat, recesivna oblika dolg vrat). Gen A pa omogoča (dominantna oblika) ali preprečuje (recesivna oblika) nastanek moških cvetov. Rastline, ki imajo dominantni obliki (GA/–), torej tvorijo ženske cvetove s kratkim pestičem in poleg njih tudi moške cvetove; rastline z recesivno obliko teh dveh genov (ga/ga) pa tvorijo samo ženske cvetove z dolgim vratom pestiča brez moških cvetov. V divjih populacijah nastajajo semena na obeh tipih rastlin, s tem da v sikoniju na »moški« rastlini redko nastane več kot deset semen. Le v tem primeru je del semen lahko tudi homozigoten GA/GA. Vsi potomci križanja takih rastlin z ženskimi rastlinami bi bili moški. Če pride do oploditve pestičev s kratkim vratom v sikonijih z moškimi cvetovi, se lahko razvije mesnato oplodje, podobno kot pri ženskih rastlinah (Bohanec in sod., 2008).

### 2.1.3 Gojene fige

Gojena oblika fige je morfološko podobna divjim in podivjanim oblikam fige, ki so zelo razširjene v Sredozemlju. Fige so razširjene povsod, v primarnih (slika 5) in sekundarnih (robovi plantaž, ruševine, razpadajoče cisterne, na vhodih v jame) habitatih. Fige sekundarnih habitatov so najverjetneje nastale iz lokalno gojenih klonov, ki so se oprášili z divje rastočimi kaprifigami. Tako nastale fige imenujmo podivjane oblike fige. Divje oblike imajo navadno enako razmerje med ženskimi rastlinami in kaprifigami. Divje ženske rastline imajo običajno majhne in manj užitne plodove. Sredozemske divje fige so tesno povezane s skupino nesredozemskih divjih fig, diecičnimi *Ficus* tipi, ki so razširjeni na jugu in vzhodu sredozemskega bazena. Taksonomsko vse oblikujejo eno samo naravno skupino znotraj rodu *Ficus*. Nesredozemske fige so bile morfološko in deloma genetsko pregledane. Vse imajo enako število kromosomov kot gojene ( $2n=26$ ). Vsi predstavniki se med seboj neovirano križajo, vendar so prilagojeni na različne ekološke dejavnike (Zohary in Hopf, 2000). Ker nekateri genotipi fig potrebujejo za razvoj plodov kaprifikacijo in polinacijsko osico šiškaričo, je v naravnih in agro-ekosistemih zelo pomemben soobstoj divjih in kultiviranih oblik. Genetska povezava med divjimi in kultiviranimi oblikami pa je še zelo nejasna (Bandelj in sod., 2007). Pri sredozemskih sadnih vrstah, kamor sodi tudi figa, je težko razlikovati med divjimi in kultiviranimi oblikami iz različnih razlogov:

- ker so dolgoživeče vrste, loči obstoječe kultivarje od njihovih divjih prednikov le nekaj generacij,
- zaradi soobstoja divjih in gojenih fig je med obema oblikama mogoč genski pretok,
- kultivirane oblike je človek s preseljevanjem zanesel na različna območja Sredozemlja (Khadari in sod, 2003).



**Slika 5:** Primarni habitat fige (Foto: Dunja Bandelj).

### 2.1.3.1 Gojenje fige

Figa je eden prvih gojenih sadežev (slika 6). Zelo dobro je prilagojena na sredozemsko okolje z mrzlimi zimami in vročimi, suhimi poletji. Zato je tržna pridelava skoncentrirana v klimatih z vročimi in suhimi poletji. Figa dobro uspeva na peščenih tleh ali na težkih glinenih in tudi apnenčastih tleh. Ker se zlahka ukoreninijo iz potaknjencev je to splošno razširjena metoda propagacije.

Fige vzgajajo od 12 do 15 mesecev v drevesnici in jih nato presadijo v sadovnjake. V naslednjem letu obrodijo le nekaj plodov. Prava tržna pridelava pa se prične po treh letih. Sadovnjake fig ni potrebno regulirano gnojiti, razen če so tla peščena. Sadovnjaki za pridelavo suhih fig se razlikujejo od tistih, kjer pridelujejo fige za prodajo svežih plodov (Stover in sod., 2007).



**Slika 6:** Sadež gojene fige (Foto: Maja Podgornik).

### 2.1.3.2 Škodljivci in bolezni pri figi

Najpomembnejši in najbolj razširjeni škodljivci fige so gliste iz rodu *Meloidogyne*. Fige nimajo veliko škodljivcev in bolezni, razen v območjih, kjer so tudi poleti obilne padavine. V sadovnjakih fig se zato le redko uporablja fitofarmacevtska sredstva.

Suhe plodove občasno napadajo členonožci: *Carpophilus hemipterus* in *Ephesia figulilella*. Na območjih poletnih padavin plodovi navadno pokajo, zato uporabljajo

fungicide za zatiranje *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis* in glive *Penicillium*. Glive se ohranjajo v kaprifigah, v užitne fige pa se prenesejo s pomočjo osic.

Svetovno razširjena bolezen je t.i. FMD (fig mosaic disease). Pri tej bolezni se pojavijo simptomi, značilni za mozaični virus: rumeni obroči na listih in včasih tudi simptomi na plodovih (slika 7). Poleg tega se zmanjša tudi produktivnost drevesa. Glavnega povzročitelja FMD še niso potrdili. Domnevajo, da gre za virus ali kompleks virusov, ki ga prenaša pršica *Aceria ficus* (Stover in sod., 2007).



**Slika 7:** Simptomi, značilni za mozaični virus fige.  
(<http://www.jardin-mundani.com/images0/mosaic-virus-fig-tree8>).

#### 2.1.4 Hranilne in druge koristne snovi v figah

V figah je visoka vsebnost mineralov, topnih vlaknin in polifenolov. Topne vlaknine pomagajo pri uravnavanju sladkorja v krvi in znižujejo vsebnost holesterola v krvi, ker se vežejo nanj v prebavnem traktu. Polifenoli so posredni zaviralci rakavih obolenj. V figah so prisotni tudi benzaldehidi, ki jih uporabljajo pri zdravljenju človeških karcinomov in kumarini, ki so učinkoviti pri zdravljenju raka na prostati in kožnega raka. Na podlagi znanih dejstev potekajo številne raziskave, ki bodo pokazale ali uživanje fig zmanjšuje tveganje, da zbolimo za rakom. Postavlja se tudi vprašanje, če fige res zmanjšujejo oksidativne poškodbe DNA, količino lipidov in oksidativne poškodbe LDL (lipoproteini nizke gostote) ter s tem zmanjšujejo pojavljanje srčnih bolezni. Fige so izjemne tudi v tem, da poleg vseh koristnih snovi ne vsebujejo natrija, maščob in holesterola (Vinson, 1999).

## 2.2 METODE ZA RAZISKOVANJE GENETSKE RAZNOLIKOSTI

Prve metode, ki so se uporabljale za vrednotenje variabilnosti rastlin, so temeljile na fenotipskih ali morfoloških značilnostih. Uporaba le teh je bila povezana s številnimi metodološkimi težavami, kot so zamudno delo, omejeno število razpoložljivih opisnih znakov, odvisnost od razvojne stopnje rastline in okolja ter subjektivni pristop pri vrednotenju. Razvoj in uporaba izoenzimov sta genetsko analizo vodila na molekularni nivo, vendar je bila zaradi majhne številčnosti njihova uporaba omejena. Razvoj molekularnih metod za raziskovanje genetske raznolikosti je omogočil revolucionaren pristop proučevanja genomov (Edwards in Mogg, 2001).

Analiza sekundarnih metabolitov je omejena na tiste rastline, ki proizvajajo konstantne količine metabolitov, neodvisno od okoljskih dejavnikov. Le pri tovrstnih rastlinah lahko analiziramo sekundarne metabolite in na podlagi rezultatov razlikujemo med posamezniki iste vrste. Če želimo za raziskovanje genetske raznolikosti uporabljati metabolite, morajo biti le-ti popolnoma neobčutljivi za spremembe v okolju. Zaradi tega so metode, ki temeljijo na DNA bistveno primernejše, saj so bolj stabilne in značilne za vse živeče organizme (Sharma in sod., 2008).

Katerokoli zaporedje DNA, ki ga lahko brez večjih težav odkrijemo in spremljamo njegovo dedovanje, je primerno orodje za raziskovanje genetske raznolikosti. Danes imamo na razpolago kar nekaj molekularnih metod za raziskovanje genetske raznolikosti, ki se razlikujejo v svojih lastnostih, informativnosti, ceni razvoja molekularne metode in zahtevnosti tehnike. Glede na namen proučevanja organizma lahko izbiramo med različnimi metodami: metoda polimorfizma dolžin restriksijskih fragmentov (RFLP<sup>1</sup>), metoda naključno namnožene polimorfne DNA (RAPD<sup>2</sup>), metoda polimorfizma dolžin namnoženih fragmentov (AFLP<sup>3</sup>) in metoda mikrosatelitskih lokusov.

Potrebne lastnosti molekularne metode, ki se jo uporablja v namene genotipizacije, so:

- je enostavno dostopna,
- njeni rezultati so visoko polimorfni in reproduktivni,
- je enostavna in hitra za testiranje,
- je neodvisna od okoljskih dejavnikov,
- mogoče so izmenjave in primerjave podatkov med laboratoriji (Sharma in sod., 2008).

---

<sup>1</sup> Angl. Restriction Fragment Length Polymorphism

<sup>2</sup> Angl. Randomly Amplified Polymorphic DNA

<sup>3</sup> Angl. Amplified Fragment Length Polymorphism

### 2.2.1 Metoda RAPD

V zadnjem desetletju so bili fragmenti RAPD (naključno namnožena polimorfna DNA) najpogosteje uporabljeni za proučevanje genoma fige. Raziskovalci so jih uporabili v obsežnih študijah genetske sorodnosti oz. raznolikosti fig (Salhi-Hannachi in sod, 2005; Cabrita in sod., 2000; Salhi-Hannachi in sod., 2003; De Masi in sod., 2005; Ikegami in sod., 2008), za identifikacijo in karakterizacijo sort (Khadari in sod., 1994) ter za ugotavljanje polimorfizma pri figah (Sadder in Ateyyeh, 2005).

Popularnost tehnike RAPD je bila velika v začetku 1990-ih zaradi enostavnosti in uporabnosti tudi v laboratorijih z enostavno raziskovalno opremo. Tehniko sta neodvisno in istočasno razvili dve raziskovalni skupini. Williams in sod. (1990) so jo uporabili za gensko kartiranje in jo poimenovali RAPD. Welsh in McClelland (1990) pa sta jo poimenovala AP-PCR<sup>4</sup> in jo uporabila za prstni odtis DNA<sup>5</sup>. Različico tehnike RAPD so Caetano-Anollés in sod. (1991) poimenovali DAF<sup>6</sup>. Tehnika RAPD temelji na namnoževanju neznanih predelov DNA z uporabo začetnega oligonukleotida s poljubnim nukleotidnim zaporedjem v verižni reakciji s polimerazo (PCR<sup>7</sup>). Rezultat namnoževanja so produkti ali fragmenti RAPD, ki se ločijo z elektroforezo na agaroznem gelu. Ločene produkte se nato zaznava s pomočjo etidijevega bromida, pod UV svetlobo (Williams in sod., 1990). AP-PCR in DAF tehniki imata enak princip delovanja. Razlika je le v zaznavanju namnoženih produktov: AP-PCR se poslužuje akrilamidnih gelov in rentgenskega slikanja (Welsh in McClelland, 1990), DAF pa poleg akrilamidnega gela uporablja barvanje s srebrom (Caetano- Anollés in sod., 1991).

Namnoženi fragmenti RAPD izvirajo iz različnih genomskih regij. V reakciji se namreč uporablja le en začetni oligonukleotid. Če ta na ciljni DNA verigi najde dve nasproti si orientirani vezavni mesti, ki sta si dovolj blizu, se v ciklih reakcije PCR definiran fragment namnoži. Izvor polimorfizma namnoženih fragmentov RAPD Williams in sod. (1990) pripisujejo:

- nukleotidnim spremembam na vezavnih mestih začetnega oligonukleotida,
- deleciji vezavnega mesta začetnega oligonukleotida,
- inserciji delov DNA med vezavnimi mesti začetnih oligonukleotidov, ki ju tako oddalji, da namnoževanje vmesnega dela ni več mogoče,
- insercijam in delecijam delov DNA med vezavnimi mesti začetnih oligonukleotidov, kar spremeni dolžino namnoženega produkta.

---

<sup>4</sup> Angl. Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction

<sup>5</sup> Angl. Fingerprinting DNA

<sup>6</sup> Angl. DNA Amplification Fingerprinting

<sup>7</sup> Angl. Polymerase Chain Reaction

Polimorfizem analiziranih osebkov se proučuje s primerjavo profilov DNA različnih organizmov. Razlike med organizmi so opažene s prisotnostjo ali odsotnostjo določenega fragmenta ali produkta RAPD (Rafalski in Tingey, 1993).

Namnoženi fragmenti RAPD so priljubljeni tudi zato, ker metoda ne vključuje hibridizacije in zato niso potrebne radioaktivne sonde. Za reakcije so potrebne majhne koncentracije DNA in v kratkem času lahko analiziramo veliko število vzorcev. Tehnika je uporabna tudi za proučevanje manj znanih vrst, saj ni nujno predhodno poznavanje nukleotidnih zaporedij genoma (Karp in Edwards, 1995).

Namnoženi fragmenti RAPD imajo tudi določene pomanjkljivosti. Kakovost reakcije v cikličnem termostatu je odvisna od kakovosti, stabilnosti in koncentracije izhodiščno izolirane DNA, občutljivosti za temperaturni profil, od kakovosti in koncentracije encima *Taq* polimeraze,  $MgCl_2$  in začetnih oligonukleotidov (Yu in sod., 1992; MacPherson in sod., 1993). Jones in sod. (1997) so pri proučevanju ponovljivosti tehnike RAPD v 9-ih evropskih laboratorijih ugotovili nezadostno ponovljivost rezultatov zaradi uporabe cikličnih termostatov in *Taq* polimeraze različnih proizvajalcev. Težave so lahko prisotne tudi pri vrednotenju in interpretaciji kompleksnih elektroforegramov. Pri ponavljanju analiz se lahko pojavijo tudi novi fragmenti. Zanesljivost takih elektroforegramov je sicer vprašljiva. A temu se lahko do določene mere izognemo, če pri vrednotenju upoštevamo le tiste fragmente, ki so v ponovitvah reakcije PCR vedno prisotni in močne intenzitete (Karp in Edwards, 1995).

Omejenost tehnike RAPD je včasih povezana tudi z naravo namnoženih fragmentov RAPD. Ti so dominantni, kar pomeni, da ne moremo ločiti heterozigotnih od homozigotnih dominantnih osebkov. Z določitvijo nukleotidnega zaporedja namnoženega fragmenta RAPD in izdelavo nekoliko daljših specifičnih začetnih oligonukleotidov, lahko dominantne produkte RAPD spremenimo v kodominantne produkte SCAR<sup>8</sup> (namnoženi fragmenti, določeni z nukleotidnim zaporedjem; Paran in Michelmore, 1993). Produkti SCAR tako izboljšajo ponovljivost in zanesljivost rezultatov.

### 2.2.2 Mikrosatelitski lokusi

Skupna lastnost evkariotskih genomov je, da vsebujejo tandemsko ponavljajočo se DNA, ki so jo poimenovali satelitna DNA. Odkrili so jo z gradientnim ultracentrifugiranjem. Glede na dolžino osnovnega motiva delimo satelitno DNA v tri skupine (Armour in sod., 1999):

1. sateliti: sestavljeni iz osnovnega nukleotidnega zaporedja (motiva) dolžine do 200 baznih parov (bp), več takih ponovitev skupaj tvori satelit, ki ima lahko skupno dolžino nekaj megabaznih parov in predstavlja nekaj odstotkov genoma,

---

<sup>8</sup> Angl. Sequence Characterized Amplified Region



2. minisateliti: vsebujejo osnovni motiv sestavljen iz več kot 10-ih nukleotidov in lahko dosežejo skupno dolžino od 0,5 do 30 kbp,
3. mikrosateliti: osnovni motiv je kratek in na posameznem lokusu tvori bloke skupne dolžine od 20 do 100 bp.

Mikrosateliti ali kratke tandemske ponovitve so sestavljeni iz kratkih, tandemsko ponovljenih nukleotidnih zaporedij t. i. osnovnega motiva dolžine od 1 do 6 nukleotidov, ki se ponavljajo v identičnih ali sorodnih kopijah kot vagoni v vlakovni kompoziciji (Chistiakov in sod., 2005).

V literaturi najdemo različna poimenovanja mikrosatelitov: kratke tandemske ponovitve (STR<sup>9</sup>), ponovitve enostavnih zaporedij (SSR<sup>10</sup>), polimorfizem dolžin enostavnih zaporedij (SSLP<sup>11</sup>) in spremenljivo število tandemskih ponovitev (VNTR<sup>12</sup>). V zadnjem času se v literaturi najpogosteje pojavlja izraz mikrosatelit in je verjetno najprimernejši za označevanje enostavnih ponavljajočih se zaporedij (Hancock, 1999).

Glede na tip ponovitve osnovnega motiva predlagata Chambers in MacAvoy (2000) naslednjo razdelitev mikrosatelitov:

- popoln mikrosatelit<sup>13</sup> je sestavljen iz enega samega motiva baz, ki se tandemsko ponavlja in ni prekinjen z nobeno drugo bazo, npr.  $-(AC)_{14}-$ ;
- popoln in prekinjen mikrosatelit<sup>14</sup> ima osnoven motiv prekinjen z insercijo enega nukleotida ali več baznih parov, ki so različni od osnovnega motiva, npr.  $-TA-(CA)_4-TA-(CA)_7$ ;
- sestavljen mikrosatelit<sup>15</sup> sestavljata vsaj dva različna osnovna motiva, npr.  $-(CT)_{22}-(CA)_6$ ;
- sestavljen in prekinjen mikrosatelit<sup>16</sup> ima poleg vsaj dveh različnih osnovnih motivov še krajšo insercijo baznih parov, ki se razlikujejo od osnovnih motivov, npr.  $-(AC)_{14}-AG-AA-(AG)_{12}$ ;
- kompleksni mikrosatelit<sup>17</sup> je širši izraz za popolne in sestavljene mikrosatelite, ki nastanejo zaradi insercij baz, ki predstavljajo kratko ponovitev, npr.  $(TTTC)_{3-4}-(T)_6-(CT)_{0-1}-(CYKY)_n-CTCC-(TTCC)_{2-4}$ ;
- prekinjen kompleksni mikrosatelit<sup>18</sup> predstavlja alele na nekem lokusu, pri katerih znotraj osnovnih motivov prihaja do prekinitve.

---

<sup>9</sup> Angl. Short Tandem Repeat

<sup>10</sup> Angl. Simple Sequence Repeat

<sup>11</sup> Angl. Simple Sequence Length Polymorphism

<sup>12</sup> Angl. Variable Number of Tandem Repeat

<sup>13</sup> Angl. pure microsatellite

<sup>14</sup> Angl. interrupted pure microsatellite

<sup>15</sup> Angl. compound microsatellite

<sup>16</sup> Angl. interrupted compound microsatellite

<sup>17</sup> Angl. complex microsatellite

<sup>18</sup> Angl. interrupted complex microsatellite

Nestabilnost mikrosatelitskih lokusov in posledično velika variabilnost mikrosatelitskih alelov sta prispevala k popularnosti mikrosatelitov in njihove uporabe v mnogih evolucijskih in genetskih študijah. Velik polimorfizem je posledica spremembe v številu ponovitev osnovnega motiva. Za to sta predvsem odgovorna dva mehanizma, ki se najverjetneje dopolnjujeta (Eisen, 1999):

1. Model nepravilnega parjenja zdrsnjenih verig med podvojevanjem DNA (model SSM<sup>19</sup>) predvideva mutacijo, ki jo povzroči zdrs DNA v kompleksu s polimerazo, kar povzroči nekomplementarnost matrične in novo sintetizirane verige. V kolikor popravljalni mehanizmi napake zaradi zdrsa ne popravijo, ostane poravnava obeh verig nepravilna. Mikrosatelitske ponovitve se zlahka izvijajo iz vijahnice v obliki zank. Nova sintetizirana veriga bo tako v naslednjih replikacijah spremenila svojo dolžino. Pri mikrosatelitu se to kaže v nastanku ali izgubi ene ali več ponovitev.
2. Neenako prekrivanje (crossing-over) (model UCO<sup>20</sup>) nastane kot rezultat rekombinacije med homolognima kromosomoma, ki nista bila popolno poravnana. Verjetnost nepravilne poravnave je zaradi prisotnosti mikrosatelitskih ponovitev velika.

Mutacijska stopnja vseh mikrosatelitskih lokusov ni enaka. Dognali so, da na njen nivo vplivajo: število ponovitev in nukleotidno zaporedje osnovnega motiva, dolžina ponavljajoče se enote, DNA zaporedje obrobni regij, prekinitve v mikrosatelitu, stopnja rekombinacije in transkripcije. Ocenjujejo, da je stopnja mutacij mikrosatelitov  $10^{-2}$  do  $10^{-6}$  mutacij na lokus na generacijo, kar je mnogo višje v primerjavi s točkovnimi mutacijami na kodirajočih lokusih genov, ki se gibljejo od  $10^{-9}$  do  $10^{-10}$  mutacij na lokus na generacijo (Schlötter, 2000).

Nukleotidna zaporedja mikrosatelitov se nahajajo v nekodirajočih regijah in v kodirajočih regijah genoma (Toth in sod., 2000). V evkariontskih organizmih prevladujejo mikrosateliti v nekodirajočih regijah (Metzgar in sod., 2000). Redkeje se pojavljajo v kodirajočih delih DNA, tako pri višjih rastlinah (7-10%) kot pri vretenčarjih (9-15%) (Chistiakov in sod., 2005). Relativno nizke frekvence mikrosatelitov v kodirajočih regijah lahko razložimo z negativno selekcijo zoper mutacij, ki povzročajo premik bralnega okvirja v kodirajočih delih DNA (You-Chun in sod., 2002).

Številne študije dokazujejo, da so mikrosateliti tudi pomembni funkcionalni elementi. In sicer pri strukturi DNA: mikrosateliti so pogosti v telomerih in centromerih, zato so pomembni pri organizaciji strukture kromosomov. Pomembni so pri rekombinaciji DNA: dinukleotidni motivi so preferenčna mesta za rekombinacijo, ker imajo visoko afiniteto do rekombinacijskih encimov. Nekatera mikrosatelitska zaporedja, kot so GT, CA, CT, GA, lahko neposredno vplivajo na rekombinacijo s spremembo strukture DNA. Pripisujejo jim vlogo pri replikaciji DNA: človeški geni kodirajo pomembne celične rastne

---

<sup>19</sup> Angl. Slip-Strand Mismatching

<sup>20</sup> Angl. Unequal Crossing-Over

faktorje, ki vsebujejo kratke ponavljajoče sekvence. Pomanjkanje sistemov za popravljenje neujemanj (MMR<sup>21</sup>) sproži mutacije, ki povzročijo premik bralnega okvirja. Pojavijo se delecije in insercije tandemske ponavljajočih se enot mikrosatelitskih zaporedij, ki posledično prizadenejo te gene in lahko sprožijo tumorske procese. Kot funkcionalni elementi so pomembni tudi pri ekspresiji genov: mikrosateliti se kot regulacijska nukleotidna zaporedja nahajajo v distalnih promotorskih delih in delujejo kot elementi, ki ojačajo transkripcijo. V teh delih delujejo kot vezavna mesta za regulacijske proteine (Chistiakov in sod., 2005).

Morgante in Olivieri (1993) sta med prvimi podala podrobnejši pregled zastopanosti mikrosatelitov v genomu višjih rastlin. Proučila sta pogostost pojavljanja dinukleotidnih in trinukleotidnih mikrosatelitskih ponovitev. Morgante in sod. (2002) so proučili zastopanost mikrosatelitskih ponovitev v genomske knjižnici in v knjižnici izraženih nukleotidnih zaporedij (EST<sup>22</sup>) repnjakovca (*Arabidopsis thaliana*), riža, soje, koruze in pšenice. Ugotovili so, da je frekvenca pojavljanja mikrosatelitov obratno sorazmerna z velikostjo genoma in deležem ponavljajoče se DNA in ostaja konstantna v kodogenem delu genoma. Mikrosateliti so večinoma prisotni v tistih regijah, ki predstavljajo nedavno povečanje genoma v rastlinah. Njihova frekvenca je večja v prepisanih regijah, posebno v neprevedenem delu mRNA, kjer je lahko večja celo za 3-krat.

Prednosti uporabe mikrosatelitov so (You-Chun in sod., 2002; Estoup in Angers, 1998):

- našli so jih v vseh do sedaj analiziranih genomih,
- njihova pogostnost in razpršenost v genomu je odvisna od taksonomske skupine,
- večinoma so brez očitne funkcije,
- so variabilni, pogosto z visoko stopnjo polimorfizma in zaradi tega zelo informativni,
- so lokusno specifični,
- dedujejo se kodominantno in po Mendlovih pravilih,
- obrobne regije mikrosatelitov so večinoma ohranjene med ozko sorodnimi vrstami.

Tehnične prednosti uporabe so (Estoup in Angers, 1998):

- majhna količina tkiva za analizo, ker so pri PCR potrebne nanogramske količine DNA,
- elektroforetsko ločevanje produktov PCR na visoko ločljivostnih gelih,
- možnost določevanja dolžine mikrosatelitov na avtomatskih aparaturah z ustrežno programsko opremo,
- informacije o začetnih oligonukleotidih in dolžinah alelov so primerljive med laboratoriji.

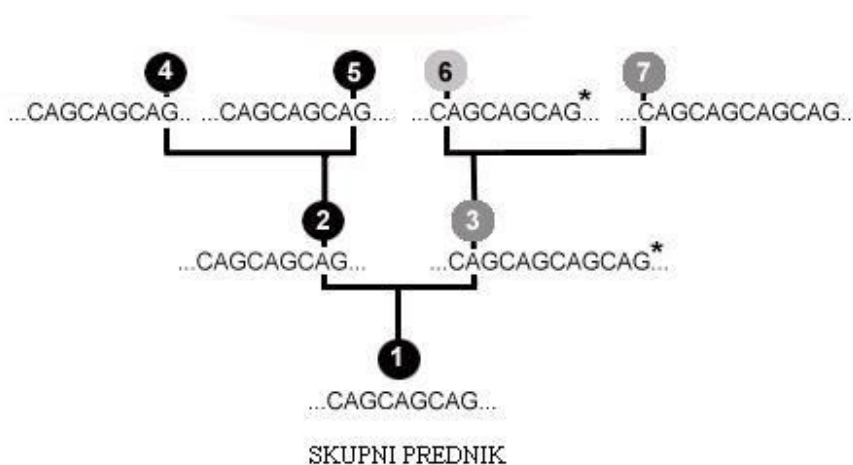
---

<sup>21</sup> Angl. Mismatch repair systems

<sup>22</sup> Angl. Expressed Sequence Tags

Pri uporabi mikrosatelitov se pojavljajo naslednje težave:

- **HOMOPLAZIJA**; homoplazija pri mikrosatelitih pomeni prisotnost vsaj dveh alelov z enako dolžino na istem lokusu, ki imata različen izvor (slika 8). Dolžinski polimorfizem mikrosatelitov lahko zaradi homoplazije zavaja genetsko analizo. Homoplazijo lahko potrdimo s sekvenciranjem namnoženih mikrosatelitov. Neupoštevanje homoplazije pri populacijskih študijah vodi do podcenejvanja dejanske raznolikosti med populacijami (Jarne in Lagoda, 1996). Vpliv homoplazije na rezultate se zmanjša s povečanjem števila mikrosatelitskih lokusov v raziskavi. Predvidevajo, da se homoplazija povečuje s stopnjo mutacij in s časom divergence med populacijami (Estoup in Angers, 1998).



**Slika 8:** Homoplazija.

Iz alela 1 (CAG)<sub>3</sub> sta nastala alela 2 in 3. V alelu 3 je z mutacijo nastala še ena ponovitev CAG. V naslednji generaciji sta iz alela 3 nastala dva nova alela 6 in 7. Alel 6 ima eno ponovitev motiva manj in je enak izvornemu alelu 1. Alel 7 pa ima štiri ponovitve osnovnega motiva. V drugi liniji se je ohranilo izvorno število ponovitev motiva. Na mikrosatelitskem lokusu so aleli 4, 5, in 6 enaki, kljub različnemu evolucijskemu izvoru (Goodman, 1998).

- **VEZAVNO NERAVNOVESJE** (linkage disequilibrium); za mikrosatelitske lokuse velja splošna predpostavka, da se dedujejo neodvisno od drugih lokusov. Zgodi se, da se frekvence alelov v populaciji razlikujejo od predvidenih frekvenc alelov, za katere velja predpostavka, da se dedujejo neodvisno. Lokusi takih alelov so v vezavnem neravnovesju, kar pomeni, da se aleli s teh lokusov dedujejo skupaj še z drugim lokusom. Vezavno neravnovesje pomeni statistično povezavo med različnimi lokusi. Vzroki za vezavno neravnovesje so mutacije, ki so se zgodile pred kratkim, selekcija, populacijska struktura ali pa, da sta dva alela na istem kromosomu tako blizu, da se vedno dedujeta skupaj (Griffiths in sod., 2008).

- NEVIDNI ALELI; uspešno namnoževanje mikrosatelitskih lokusov s PCR je odvisno tudi od prileganja začetnih oligonukleotidov na matrično DNA. Točkaste mutacije, substitucija ali delecija baz na mestu prileganja lahko zmanjšajo ali preprečijo prileganje enega ali obeh začetnih oligonukleotidov. Nevidni aleli<sup>23</sup> spadajo zato med tehnične napake in predstavljajo alele mikrosatelitov, ki se ne namnožijo v reakciji PCR. Nevidnega alela ne moremo odkriti, kadar je zamaskiran z namnožitvijo normalnega alela homolognega kromosoma. Pri homozigotnem osebku ne dobimo nobenega produkta v reakciji PCR. Genotip heterozigotnega osebka pa napačno interpretiramo kot genotip homozigota. Pri obravnavi populacije je navzočnost nevidnih alelov glavni vzrok za veliko odstopanje med dejansko in pričakovano heterozigotnostjo, kjer je prisoten presežek homozigotov v populaciji (Freeland, 2005). Nevidne alele lahko odkrijemo tudi kot odklon od Mendlovih pravil dedovanja pri analizi izvora potomcev (Estoup in Angers, 1998). Kadar nevidni aleli preveč vplivajo na analize, je treba za namnoževanje narediti nove začetne oligonukleotide.
- WAHLUNDOV POJAV; Wahlundov pojav pomeni znižanje deleža heterozigotnih osebkov v populaciji, ker je populacija razdeljena na subpopulacije. Če imata dve ali več subpopulacij različne frekvence alelov in se subpopulacije nahajajo v Hardy-Weinbergovem ravnovesju, potem ima celotna populacija znižano heterozigotnost. V primeru, da ne poznamo mej subpopulacij in združimo osebkove v več subpopulacij, bo takšna populacija odstopala od Hardy-Weinbergovega ravnovesja in bo vodila v napačno predpostavljane vpliva selekcijskih faktorjev, ki favorizirajo homozigote (Freeland, 2005).

Ko so mikrosateliti za določeno vrsto že poznani, se lahko uporabijo tudi za molekularno-genetske analize sorodnih vrst. S tem se znižajo stroški analiz, saj ni več potrebna izdelava genomskih knjižnic. Med sorodnimi vrstami so lahko ohranjena obrobna zaporedja mikrosatelitske DNA. Zato nekateri začetni oligonukleotidi, pripravljene za eno vrsto, uspešno namnožujejo tudi regijo DNA druge vrste (Huang in sod., 1998). Z določitvijo nukleotidnega zaporedja so dognali, da so razlike med aleli različnih vrst kompleksnejše. Ne gre le za razlike v spremembi števila ponovitev osnovnega motiva, temveč so razlike tudi v strukturi mikrosatelita (Peakall in sod., 1998). Uspešnost medvrstne uporabe mikrosatelitov upada s povečevanjem filogenetske oddaljenosti vrst (Schlötterer, 1998).

Mikrosateliti so zaradi hipervariabilnosti idealno orodje za molekularno identifikacijo posameznikov. Vsak posameznik ima edinstven vzorec alelov. Ker je vzorec osebno specifičen, ga imenujemo genetski profil (profil DNA). Najbolj razširjeni tehniki sta določanje profila DNA (DNA-profiliranje) in določanje »prstnih odtisov DNA«<sup>24</sup>. Rutinsko ju uporabljajo v sodnomedicinskih raziskavah za prepoznavanje oseb in ugotavljanje sorodstvenih vezi (Zupančič, 1998). Tudi pri rastlinah so mikrosateliti

---

<sup>23</sup> Angl. Null allele

<sup>24</sup> Angl. DNA fingerprinting

primerni za genotipiziranje in identifikacijo sort, kultivarjev klonov in akcesij. S pomočjo mikrosatelitov se ugotavljajo tudi nepravilnosti pri poimenovanju sort, ki nastajajo zaradi sinonimov in homonimov in so značilni za mnoge rastlinske vrste, predvsem tiste, ki se klonsko razmnožujejo.

Mikrosatelite so uspešno uporabili tudi v rastlinski genetiki pri ugotavljanju genetske sorodnosti med posamezniki. Ker se dedujejo kodominantno so idealno orodje za starševske analize in analize rodovnikov. S pomočjo mikrosatelitov lahko pridobimo informacije o žlahtnjenju neke rastline in o strukturi populacij.

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 RASTLINSKI MATERIAL

Za rastlinski material smo izbrali skupino divje rastočih fig, vzorčenih v Slovenski Istri in Dalmaciji. Določili smo štiri večje lokacije:

1. **slovenska Istra** (Osp, Koper, Izola, Seča, Portorož): je razmeroma majhna pokrajina in ima kot celota submediteransko podnebje. To se od pravega mediteranskega razlikuje po nekoliko nižjih temperaturah, predvsem pa po padavinskem režimu, kjer izostane razdelitev na izrazito sušno dobo poleti in mokro pozimi. Najpogostejši vetrovi so burja, jugo in obalna zračna cirkulacija. Prerašča jo submediteranska listopadna vegetacija. Prava zimzelena mediteranska vegetacija je zastopana le fragmentarno (Ogrin, 1996).

2. **dolina reke Cetine**: hrvaška reka Cetina teče 60 km po dolini (slika 9), kjer se razprostira rodovitna zemlja. Dolina je od Jadranskega morja ločena z gorovjem Biokovo. Lega med morjem in goratim zaledjem vpliva na mešanje podnebnih razmer. Gre za submediteransko podnebje, ki se odraža tudi na vegetaciji.



**Slika 9:** Dolina reke Cetine in gorovje Biokovo.  
(<http://www.omisinfo.com/omis/omis-nature/cetina-river.htm>).

3. **otok Hvar**: je najdaljši otok v srednjem Jadranu, z nadmorsko višino 628 m. Ima izredno blago mediteransko podnebje, s toplimi poletji, blagimi zimami in najdaljšo insolacijo na Hrvaškem (2781 ur na leto). Vegetacija je prilagojena suši. Naravno raste

sestavljajo zimzeleni listavci, bori in grmovno rastlinstvo. Gozd sega skoraj povsod do obale, ki je bolj razčlenjena na severni strani otoka (slika 10).



**Slika 10:** Južna obala otoka Hvara.

([http://www.common.wikimwdia.org/wiki/File:Hvar\\_J\\_obala.jpg](http://www.common.wikimwdia.org/wiki/File:Hvar_J_obala.jpg)).

**4. Črna gora in okolica Bara:** Črna gora je gorata dežela in na jugozahodu meji na Jadransko morje. Značilno je mediteransko podnebje z vročimi poletji in relativno hladnimi zimami v notranjosti. Ob vznožju planinskega masiva Rumije leži Bar, glavno пристanišče Črne gore. Vzdolž obale pa se dvigujeta še planinska masiva Lovćen in Orijen.

Na vseh štirih omenjenih območjih smo nabrali mlade liste za izolacijo DNA fige. Genetsko variabilnost divjih fig smo ugotavljali z genotipizacijo DNA 10-ih dreves s posamezne lokacije.

### 3.2 IZOLACIJA CELOKUPNE DNA

DNA fige smo izolirali iz mladih figovih listov po uveljavljenem protokolu (Kump in sod., 1992). V terilnico smo dali približno 1 cm<sup>2</sup> svežega tkiva in ga ob dodatku 1,5 ml ekstrakcijskega pufra CTAB [2 % (w/v) CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,2 % (w/v) β-merkaptoetanol], ki smo ga predhodno segreti na 68 °C, homogenizirali. Homogenizirane vzorce smo prenesli v 1,5 ml mikrocentrifugirke in jih 1,5 ure inkubirali v vodni kopeli pri 68 °C. Vzorce smo občasno rahlo premešali. Po inkubaciji smo dodali 500 μl mešanice kloroforma in izoamilalkohola, pripravljene v razmerju 24:1, in vzorce dobro premešali. Suspenzijo smo centrifugirali 15 min pri



relativni centrifugalni sili 11000 g (centrifuga Eppendorf 5415R) in temperaturi 4 °C. Supernatant smo odpipetirali v novo 1,5 ml mikrocentrifugirko in DNA oborili z dodatkom 50 µl 3 M Na-acetata (1/10 volumna, pH 5,2 uravnan z očetno kislino) in 500 µl ledeno hladnega izopropanola (1 volumen). Vzorce smo premešali in inkubirali 30 min pri -20 °C. Sledilo je 15 min centrifugiranje pri 11000 g in temperaturi 4 °C. Supernatant smo odpipetirali, usedlino DNA sprali s 500 µl 70 % etanola, ter vzorce posušili pri sobni temperaturi. DNA smo raztopili v 100 µl pufru TE [10mM Tris-HCl (pH 8,0), 1mM EDTA (pH 8,0)] in jo shranili na 4 °C do nadaljnjih analiz.

### 3.3 MERJENJE KONCENTRACIJE DNA

Koncentracijo DNA smo izmerili z mini fluorimetrom TKO100 (Hoefer Scientific, San Francisco, ZDA) po navodilih proizvajalca. Za delovno raztopino smo uporabili filtersko steriliziran 1×TNE pufer [10 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 7,4], ki smo mu dodali barvilo H33258 v koncentraciji 0,1 µg/ml (iz založne raztopine s koncentracijo 1 mg/ml). Za umeritev aparata smo uporabili DNA telečjega priželjca v koncentraciji 100 ng/µl (raztopina pripravljena v 1×TNE pufru). Glede na izmerjene koncentracije smo v dvakrat destilirani vodi pripravili razredčitev DNA na 20 ng/µl. Razredčitve smo hranili na 4 °C.

### 3.4 NAMNOŽEVANJE FRAGMENTOV RAPD

Za namnoževanje naključnih predelov DNA vzorčnih fig smo uporabili 11 začetnih oligonukleotidov (OPA-01, OPA-05, OPA-11, OPA-18, OPA-19, OPA-20, OPX-02, OPX-08, OPX-11, OPX-13, OPX-14). Nukleotidna zaporedja uporabljenih začetnih oligonukleotidov (Operon Technologies, Alameda, CA, ZDA) so predstavljena v preglednici 1. Reakcija PCR je potekala v skupnem volumnu 25 µl. Reakcijska mešanica je bila sestavljena iz 1×PCR pufru (Promega, Mannheim, Nemčija) [10 mM Tris-HCl (pH 8,3 na 20° C); 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM KCl], 3,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM koncentracije vsakega deoksinukleotida trifosfata (Sigma-ALDRICH, St. Louis, ZDA), 0,2 µM koncentracije začetnega oligonukleotida (Operon Technologies, Alameda, CA, ZDA), 0,5 enote encima *Taq* polimeraze (Promega, Mannheim, Nemčija) in 40 ng DNA fige.

Namnoževanje naključnih predelov DNA je potekalo po protokolu v cikličnem termostatu DNA-ENGINE Thermal Cycler 200 (Bio-Rad Laboratories, California, ZDA) po naslednjem temperaturnem profilu:

- začetna 4 minutna denaturacija DNA pri 95 °C,
- sledilo je 40 ciklov s ponavljanjem: a) 30 sekund pri 94 °C,  
b) 30 sekund pri 38 °C  
c) 1 minuta in 45 sekund pri 72 °C,
- končna inkubacija vzorcev 8 minut pri 72 °C.

Vzorce smo do nadaljnjih analiz hranili na 4 °C.

**Preglednica 1:** Seznam uporabljenih začetnih oligonukleotidov.

Začetni oligonukleotidi serije A in X (Operon Technologies, Alameda, CA, ZDA) ter njihovo nukleotidno zaporedje.

Št.	Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje 5'-3'
1	OPA-01	CAGGCCCTTC
2	OPA-02	TGCCGAGCTG
3	OPA-04	AATCGGGCTG
4	OPA-05	AGGGGTCTTG
5	OPA-11	CAATCGCCGT
6	OPA-18	AGGTGACCGT
7	OPA-19	CAAACGTCGG
8	OPA-20	GTTGCGATCC
9	OPX-02	TGGCGCAGTG
10	OPX-03	TGGCGCAGTG
11	OPX-04	CCGCTACCGA
12	OPX-08	CAGGGGTGGA
13	OPX-11	GGAGCCTCAG
14	OPX-12	TCGCCAGCCA
15	OPX-13	ACGGGAGCAA
16	OPX-14	ACAGGTGCTG

### 3.5 NAMNOŽEVANJE MIKROSATELITOV

Za namnoževanje mikrosatelitov smo uporabili predhodno objavljene pare začetnih oligonukleotidov (Bandelj in sod., 2007). Oznake mikrosatelitov, njihovo nukleotidno zaporedje in motivi so predstavljeni v preglednici 2. Lokusno specifični začetni oligonukleotidi so bili izdelani pri MWG-Biotech (Ebersberg, Nemčija). Liofilizirane začetne oligonukleotide, raztopljene v pufru TE, smo v 0,5 mM koncentraciji hranili na -20 °C. Reakcija PCR je potekala v skupnem volumnu 10 µl. Reakcijska mešanica je bila sestavljena iz 1×PCR pufra (Promega, Mannheim, nemčija) [10 mM Tris-HCl (pH 8,3 na 20 °C); 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM KCl], 0,2 mM koncentracije vsakega deoksinukleotida trifosfata (Sigma-ALDRICH, St. Louis, ZDA), 0,2 µM koncentracije vsakega začetnega oligonukleotida, 0,075 µM koncentracije univerzalnega M13 (-21) začetnega oligonukleotida, označenega s CY<sub>5</sub> barvilom na 5' koncu (MWG Biotech), 0,25 enote encima *Taq* polimeraze (Promega, Mannheim, Nemčija) in 20 ng DNA fige.

**Preglednica 2:** Zaporedje parov začetnih oligonukleotidov analiziranih mikrosatelitskih lokusov in osnovni motiv mikrosatelita.

Lokus	Mikrosatelitska ponovitev	Nukleotidno zaporednje parov začetnih oligonukleotidov v smeri 5' – 3'
FCUP008	(TG) <sub>22</sub>	a CATACACTTTCATGGAGCACAAA b *CCCAGATGTTTGGTGAAGG
FCUP015	(TG) <sub>18</sub>	a *CCACCGGAGATACTCGACAT b TTTGCCGAGTAGAGCTTTGAA
FCUP016	(TG) <sub>14</sub>	a CTTTCTGGAATTCAAGCTACGA b *CGACCAAGCACAAACACAT
FCUP027	(AC) <sub>19</sub>	a AACCTTTTAGTATGCCTTTGGAA b *TCCACCATCAAATCCTTCTG
FCUP038	(TG) <sub>23</sub> T(AG) <sub>11</sub>	a CAATGTATCATTTTCATCTCACGAA b *AGTTCCCATGTTTGGTTACTGA
FCUP042	(AC) <sub>9</sub> (CA) <sub>7</sub> CG (CA) <sub>7</sub> CG(CA) <sub>7</sub>	a TGTCCAATGATAAAGATGAAGAGC b *TGACTCCAACGACTCCAAA
FCUP062	(TG) <sub>20</sub>	a AACTTGGCGAGATAAACAACC b *CACTGACCTCGCTGCATT
FCUP066	(CA) <sub>14</sub>	a *CCCTCTCGAAGAAGAAGCA b CTACAGGAAATGGGCCTCAA
FCUP068	(AG) <sub>14</sub> (GAGAGAG) <sub>4</sub>	a *GGAATTACCGTCCATGGCTA b CGCCACTCTCTCTCTCCACT
FCUP070	(AG) <sub>15</sub>	a *TTCAACTTCAACCTTCACCAA b TTTGTCTAAGGAGGCTTATTGTCA

\*Začetni oligonukleotidi z vezanim univerzalnim M13 (-21) zaporedjem (5'-TGTAACAACGACGGCCAGT-3') na 5' koncih.

Namnoževanje v verižni reakciji s polimerazo je potekalo po objavljenem dvostopenjskem protokolu (Bandelj in sod., 2007). V preglednici 3 so navedene temperature prileganja začetnih oligonukleotidov posameznih mikrosatelitskih lokusov in število ciklov PCR.

**Preglednica 3:** Temperatura prileganja začetnih oligonuklotidov ter število ciklov namnoževanja.

Lokus	Temperatura prileganja (°C)	Število ciklov namnoževanja
FCUP008	57,52	25
FCUP015	57, 52	25
FCUP016	60, 55	25
FCUP027	60, 55	25
FCUP038	60, 55	25
FCUP042	60, 55	25
FCUP062	60, 55	23
FCUP066	60, 55	25
FCUP068	60, 55	28
FCUP070	60, 55	25

Namnoževanje mikrosatelitskih lokusov, razen FCUP008 in FCUP015, je potekalo v cikličnem termostatu DNA-ENGINE Thermal Cycler 200 (Bio-Rad Laboratories, California, ZDA) po naslednjem temperaturnem profilu:

- začetna 5 minutna denaturacija DNA pri 94 °C,
- sledilo je 5 ciklov s ponavljanjem:
  - a) 45 sekund pri 94 °C,
  - b) 30 sekund pri 60 °C
  - c) 1 minuta in 30 sekund pri 72 °C,
- kjer se je pri vsakem ciklu temperatura pod črko b) znižala za 1 °C, sledilo je 23, 25 oz. 28 ciklov s ponavljanjem:
  - a) 45 sekund pri 94 °C,
  - b) 30 sekund pri 55 °C,
  - c) 1 minuta in 30 sekund pri 72 °C,
- končna inkubacija vzorcev 8 minut pri 72 °C.

Namnoževanje mikrosatelitskega lokusa FCUP008 in FCUP015 je potekalo po naslednjem temperaturnem profilu:

- začetna 5 minutna denaturacija DNA pri 94 °C,
  - sledilo je 5 ciklov s ponavljanjem:
    - a) 45 sekund pri 94 °C,
    - b) 30 sekund pri 57 °C
    - c) 1 minuta in 30 sekund pri 72 °C,
- kjer se je pri vsakem ciklu temperatura pod črko b) znižala za 1 °C,
- sledilo je 25 ciklov s ponavljanjem:
    - a) 45 sekund pri 94 °C,
    - b) 30 sekund pri 52 °C,
    - c) 1 minuta in 30 sekund pri 72 °C,
  - končna inkubacija vzorcev 8 minut pri 72 °C.

Vzorci smo do nadaljnjih analiz hranili na 4 °C.

### 3.6 ZAZNAVANJE NAMNOŽENIH FRAGMENTOV RAPD

Za ločevanje namnožene DNA smo uporabili horizontalno agarozno elektroforezo v 0,5×TBE elektroforetskem pufru [44,5 mM Tris, 44,5 mM borna kislina in 1 mM EDTA] v elektroforetski napravi BIO-RAD (BIO-RAD Laboratories, Philadelphia, ZDA). Na agarozni gel SeaKem LE (FMC Bioproducts, Rockland, ZDA) koncentracije 1,4 % smo nanесли 10 µl mešanice iz reakcije PCR in nanašalnega barvila [12,5 % (w/v) Ficoll tip 400, 0,2 % (w/v) brom fenol modro]. Na gel smo nanесли tudi 200 ng DNA dolžinskega standarda Gene Ruler™ 100 baznih parov DNA Ladder Plus (Fermentas, Burlington, Canada), ki nam je omogočal določevitev dolžin fragmentov DNA. Elektroforeza je potekala pri 140 V proti pozitivno nabiti elektrodi, dokler brom fenol modro barvilo iz nanašalnega barvila ni pripotovalo približno 1 cm do konca gela. Fragmente DNA smo obarvali z etidijevim bromidom (EtBr), ki smo ga predhodno dodali v agarozni gel v koncentraciji 0,5 µg/ml. Namnožene fragmente smo opazovali na transiluminatorju UVipure (UVITEC, Cambridge, UK) in fotografirali s kamero za gel MiniBis Pro (DNR Bio Imaging System, Jeruzalem, Izrael).

### 3.7 ZAZNAVANJE NAMNOŽENIH MIKROSATELITOV

Za ločevanje namnoženih mikrosatelitov smo uporabili avtomatsko lasersko napravo ALF express II (Amersham Biosciences). Laserska naprava omogoča avtomatsko detekcijo fluorescentno označenih DNA molekul, ločenih z elektroforezo. Med elektroforezo potujejo molekule DNA po gelu, in sicer do mesta, kjer jih prestreže laserski žarek. To pa zaznajo fotodetektorji, ki so nameščeni za ploščo. Signali se nato prenesejo do računalnika, kjer jih obdela in jih vidimo kot vrhove krivulj, ki predstavljajo koncentracijo DNA. Na laserski napravi poteka elektroforeza na vertikalno nameščeni elektroforetski kaseti, ki je sestavljena iz spodnje termoplošče in navadne zgornje plošče. Preden smo pričeli z vlivanjem gela, smo plošči temeljito očistili s 96 % etanolom. Na zgornji del termoplošče smo v pasu dveh centimetrov nanесли 0,5 ml 0,3–odstotnega γ-metakriloksiopropil-trimetoksisilana (Bind Silan), pripravljenega v raztopini 95 % etanola in 2,5 % očetne kisline. V ta predel smo po vlitju gela vstavili glavnik s štiridesetimi žepki, v katere smo v nadaljevanju nanašali vzorce. Razmak med ploščama smo določili s steklenima ločevalnikoma, ki sta bila v našem primeru debela 0,5 mm. Raztopino 7,5 % denaturacijskega poliakrilamidnega gela in 7 M uree smo vlili med zgornjo elektroforetsko in spodnjo termoploščo. Gel smo polimerizirali pod UV svetlobo. Po končani polimerizaciji smo odstranili glavnik in elektroforetsko kaseto namestili na lasersko napravo. Za elektroforetski pufer smo uporabili 0,5×TBE. V posamezen žepik na gelu smo nanесли po 5 µl denaturiranega vzorca in na vsako stran elektroforetske plošče še dolžinski standard (ALFexpress Sizer, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 bp Amersham

Biosciences). Elektroforeza je potekala 180 minut pri temperaturi 55 °C, napetosti 1500 V, toku 60 mA in moči 15 W.

### 3.8 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

#### 3.8.1 Vrednotenje namnoženih fragmentov RAPD

Prisotnost določenega fragmenta pri genotipu smo označili z 1, odsotnost pa z 0. V analizi smo upoštevali le najbolj razločne in ponovljive fragmente. Poimenovali smo jih po seriji začetnega oligonukleotida in jih glede na dolžino, od najdaljšega do najkrajšega, označili z zaporedno številko. Rezultirajočo binarno matriko smo obdelali za računalniškim programom NTSYS 2.02 (Rohlf, 1998), s pomočjo katerega smo izračunali genetske razdalje med vzorci.

#### 3.8.2 Vrednotenje mikrosatelitov

Po končani elektroforezi smo podatke prenesli v program ALFwin<sup>TM</sup> AlleleLocator version 1.03 (Amersham Biosciences), ki je sestavni del računalniške opreme ALFexpress II naprave. Pri obdelavi podatkov smo najprej določili dolžine zunanjih standardov. Sledila je poravnava namnoženih mikrosatelitov z določitvijo notranjih standardov. Tako smo identificirali vrhove krivulj, ki so predstavljale namnožene mikrosatelite. Program pa je določil njihove dolžine glede na dolžine zunanjih in notranjih standardov. S programom za analizo fragmentov smo dobili rezultate v binarni obliki (prisotnost namnoženega fragmenta pri vzorcu označena z 1, odsotnost pa z 0). V nadaljevanju smo rezultirajočo matriko prenesli v NTSYS 2.02 program (Rohlf, 1998). Z njim smo izračunali genetske razdalje med vzorci.

#### 3.8.3 Genetska podobnost med posameznimi vzorci

Za izračun genetskih razdalj med posameznimi vzorci smo uporabili Jaccardov koeficient podobnosti, ki meri delež skupnih namnoženih fragmentov in je definiran kot:

$$J = \frac{w}{w + x + y} \quad (1)$$

kjer je  $w$  število parov 1-1 (oba genotipa imata prisoten fragment),  $x$  je število parov 1-0 (pri prvem genotipu je fragment prisoten, pri drugem odsoten),  $y$  pa število parov 0-1 (pri prvem genotipu je fragment odsoten, pri drugem prisoten). Vrednosti izračunanih Jaccardovih koeficientov podobnosti so med 0 (genotipa nimata nobenega skupnega fragmenta) in 1 (genotipa imata prisotne identične fragmente, zato sta identična). Matriko

Jaccardovih koeficientov smo v nadaljevanju uporabili za razvrstitev vzorcev v sorodnostne skupine z metodo UPGMA<sup>25</sup> (metoda aritmetičnega povprečja neutežnih parov). Metoda izračuna oddaljenost med skupinama kot aritmetično povprečje vseh medskupinskih oddaljenosti.

### 3.8.4 Korelacijski koeficient (r), testiran z Mantelovo statistiko (Z)

Primernost uporabljene metode smo preverili z izračunom kofenetičnih vrednosti sorodnostnih skupin, katere smo primerjali z vrednostmi Jaccardovih koeficientov v osnovni matriki. Za merjenje stopnje ujemanja med matrikama smo izračunali korelacijski koeficient (r), testiran z Mantelovo statistiko (Z) (Rohlf, 1998).

Mantelova statistika temelji na naslednji enačbi:

$$Z_{XY} = X * Y = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^i x_{ij} y_{ij} \quad (2)$$

pri čemer so  $x_{ij}$  in  $y_{ij}$  elementi matrik x in y. Če kažeta matriki veliko ujemanje, je Z večji od pričakovanega. Test primerja vrednosti Z s permutacijsko distribucijo. To jedistribucija, ki jo dobimo, če primerjamo npr. matriko x z vsemi možnimi matrikami, v katere je bila permutirana y. Ker je v praksi to število preveliko, se uporabi le naključne permutacije. Za izračunavanje smo uporabili računalniški program MXCOMP iz paketa NTSYS 2.02 (Rohlf, 1998).

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

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

### 3.8.5 Parametri, ki opredeljujejo lastnosti mikrosatelitov

V analizo genetske variabilnosti 40-ih vzorcev smo vključili različne mere variabilnosti in razločevanja ter informacijske vrednosti 10-ih mikrosatelitskih lokusov, ki so predstavljene v nadaljevanju.

---

<sup>25</sup> Angl. Unweighted Pair Group Method

a) Opažena heterozigotnost ( $H_o$ ) predstavlja delež posameznikov v vzorcu, ki so heterozigotni:

$$H_o = \frac{\text{število heterozigotnih posameznikov}}{\text{število posameznikov v populaciji}} \quad (3)$$

b) Pričakovana heterozigotnost ( $H_e$ ) ali genetska raznolikost (Nei, 1987) predstavlja delež vzorca, ki bi bil heterozigoten v primeru, da bi med posamezniki prišlo do naključnega križanja:

$$H_e = 1 - \left( \sum_{i=1}^n p_i^2 \right) \quad (4)$$

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

c) Hardy-Weinbergovo ravnovesje: v neskončno velikih populacijah z naključnim parjenjem in odsotnosti mutacije, selekcije ter migracije, se frekvence genov in genotipov iz generacije v generacijo ne spreminjajo. Pravimo, da so frekvence alelov v Hardy-Weinbergovem ravnovesju. To se vzpostavi že po eni generaciji naključnega parjenja, če na populacijo ne delujejo zgoraj omenjeni dejavniki. Odstopanja od Hardy-Weinbergovega ravnovesja nam tako omogočajo odkrivati migracijo, selekcijo, parjenje v sorodstvu in fragmentacijo populacij (Griffiths in sod., 2008).

Testirali smo, ali so aleli v Hardy-Weinbergovem ravnovesju, kar torej pomeni, da sta opažena in pričakovana heterozigotnost pri posameznem lokusu enaki. Naredili smo eksaktni test z metodo Markovske verige.

d) Frekvenca alelov ( $p_i$ ) predstavlja delež posameznega alela v vzorcu:

$$p_i = \frac{\text{pogostnost } i\text{-tega alela v vzorcu}}{\text{pogostnost vseh alelov v vzorcu}} \quad (5)$$



e) Informacijska vrednost polimorfizma (PIC) (Botstein in sod., 1980) predstavlja informativnost posameznega mikrosatelitskega lokusa oz. vrednost, pri kateri z mikrosatelitskim lokusom nedvoumno določimo identiteto posameznika in jo uporabljamo kot merilo primernosti lokusa za gensko kartiranje:

$$\text{PIC} = 1 - \left( \sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2 \quad (6)$$

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

f) Število efektivnih alelov na lokus ( $n_e$ ) (Morgante in sod., 1994) je obratno vrednosti vsot kvadriranih frekvenc alelov lokusa:

$$n_e = \left( \sum_{i=1}^n p_i^2 \right)^{-1} \quad (7)$$

pri čemer je  $p$  frekvenca  $i$ -tega alela in  $n$  število alelov na lokus. Število efektivnih alelov ( $n_e$ ) se od dejanskega števila alelov na lokus ( $n$ ) razlikuje po tem, da vključuje tudi frekvenco posameznih alelov. Vrednost  $n_e$  je običajno nižja od dejanskega števila alelov, na kar vplivajo redki aleli.

g) Verjetnost enakosti genotipov (PI) (Paetkau in sod., 1995) predstavlja verjetnost, da imata dva naključno izbrana posameznika enak genotip na proučevanem lokusu:

$$\text{PI} = \sum_{i=1}^n p_i^4 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n (2p_i p_j)^2 \quad (8)$$

pri čemer sta  $p_i$  in  $p_j$  frekvenci  $i$ -tega in  $j$ -tega alela, ter  $n$  število alelov na lokus. Nižje vrednosti PI kažejo dobro, višje pa slabo informativnost lokusa. Visoke vrednosti PI so navadno posledica nizkega števila alelov ali pa visoke frekvence enega izmed alelov na proučevanem lokusu.

Vrednosti frekvenc alelov, dejansko in pričakovano heterozigotnost ter verjetnost enakosti genotipov smo izračunali s pomočjo računalniškega programa IDENTITY 1.0 (Wagner in Sefc, 1999), informacijske vrednosti polimorfizma pa z uporabo programa CERVUS 3.0.3 (Marshall in sod., 1998). Genotipsko specifične alele smo določili z računalniškim programom MICROSAT 1.5 (Minch, 1997), število efektivnih alelov pa smo izračunali v tabeli Excel. Za testiranje Hardy-Weinbergovega ravnovesja smo uporabili računalniški program GENEPOP 4.0.10 (Raymond in Roussel, 2008).

## 4. REZULTATI

### 4.1 ANALIZA NAMNOŽENIH FRAGMENTOV RAPD

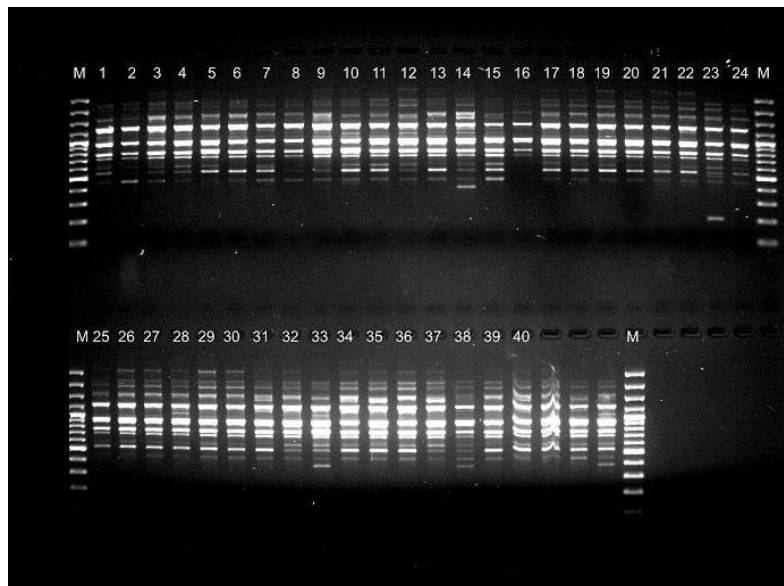
#### 4.1.1 Karakterizacija namnoženih fragmentov RAPD

Za vrednotenje molekularnega polimorfizma fig vzhodne jadranske regije smo uporabili 11 začetnih oligonukleotidov od 16 prizkušenih. Iz nadaljnje analize smo izločili začetne oligonukleotide OPA-02, OPA-04, OPX-03, OPX-04 in OPX-12. In sicer zato, ker smo z njimi v PCR namnožili veliko število slabo ločljivih in nepolimorfni fragmentov RAPD. Pri vrednotenju smo upoštevali le najintenzivnejše in ponovljive fragmente. S preostalimi začetnimi oligonukleotidi se je v PCR skupno namnožilo 87 fragmentov RAPD. Med namnoženimi fragmenti RAPD je bilo 22 monomorfnih, preostalih 65 pa polimorfni, kar predstavlja 74,4 % polimorfizem. Število vseh namnoženih in polimorfni fragmentov ugotovljenih s posameznim začetnim oligonukleotidom je prikazano v preglednici 4.

**Preglednica 4:** Seznam začetnih oligonukleotidov, število namnoženih in polimorfni fragmentov RAPD ter odstotek polimorfni pri 40-ih vzorčnih drevesih fige.

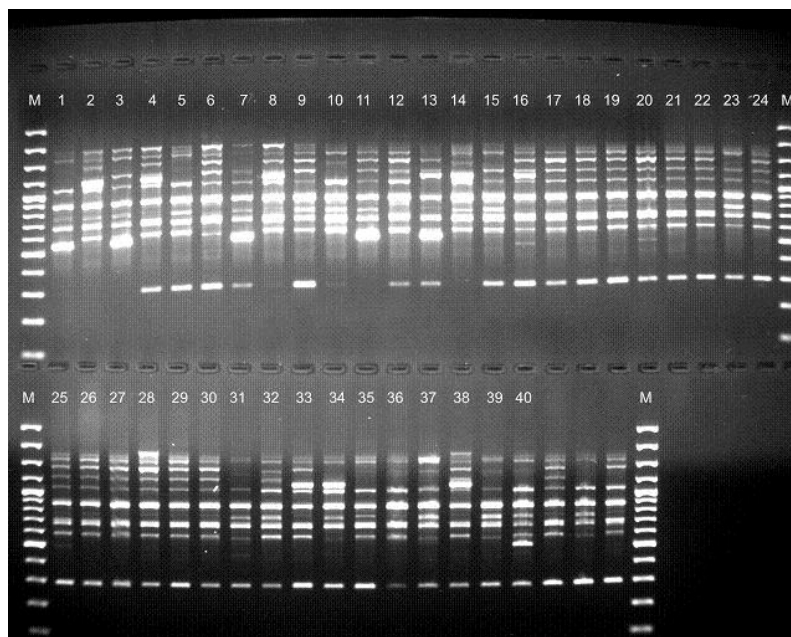
Št.	Oznaka začetnega Oligonukleotida	Število vseh namnoženih fragmentov RAPD	Število polimorfni fragmentov RAPD	Polimorfizem (%)
1	OPA-01	8	6	75
2	OPA-05	11	7	63,6
3	OPA-11	10	6	60
4	OPA-18	7	5	71,4
5	OPA-19	3	0	0
6	OPA-20	2	0	0
7	OPX-02	8	8	100
8	OPX-08	12	12	100
9	OPX-11	8	7	87,5
10	OPX-13	11	9	81,8
11	OPX-14	7	5	71,4
Skupaj <sup>1</sup> /povprečje <sup>2</sup>		87 <sup>1</sup>	65 <sup>1</sup>	74,7 <sup>2</sup>

Iz preglednice 10 je razvidno, da je bilo največ fragmentov RAPD (12) namnoženih z začetnim oligonukleotidom OPX-08. Z začetnim oligonukleotidom OPA-20 sta se namnožila le 2 fragmenta. V povprečju je bilo na začetni oligonukleotid namnoženih 7,9 fragmentov RAPD.



**Slika 11:** Na agaroznem gelu ločeni produkti reakcije PCR z začetnim oligonukleotidom OPA-05 pri 40-ih vzorcih fig.

V 1., 25., 26. in 46. koloni je velikostni standard (M) GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas).

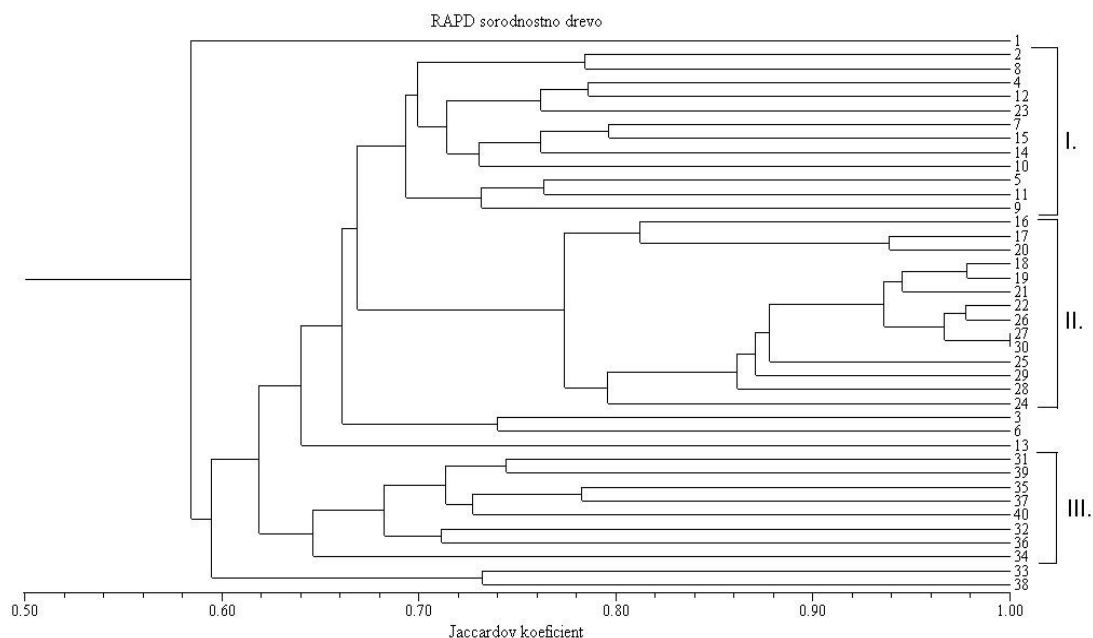


**Slika 12:** Na agaroznem gelu ločeni produkti reakcije PCR za začetni oligonukleotid OPX-13 pri 40-ih vzorcih fig.

V 1., 25., 26. in 46. koloni je velikostni standard (M) GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas).

#### 4.1.2 Genetska podobnost fig – metoda RAPD

Na osnovi prisotnosti (1) ali odsotnosti (0) določenega fragmenta RAPD pri posameznem genotipu smo izdelali binarno matriko (priloga A1). Matrika nam je služila za izračun Jaccardovih koeficientov podobnosti med vzorčnimi drevesi fig (priloga B1). Iz Jaccardove matrike podobnostnih koeficientov smo z metodo UPGMA izdelali dendrogram (sorodnostno drevo), v katerem so bila vzorčna drevesa razvrščena v sorodnostne skupine (slika 13). Iz dendrograma smo razbrali tri definirane skupine vzorcev fig. Geografsko gledano je skupina I dokaj heterogena. Vanjo se je razvrstilo 7 vzorčnih fig iz slovenske Istre (2, 4, 5, 7, 8, 9, 10), 4 iz doline reke Cetine (11, 12, 14, 15) in le 1 vzorčna figa z otoka Hvara (23). Največjo genetsko sorodnost, z najvišjimi Jaccardovimi koeficienti podobnosti, smo odkrili v skupini II, ki jo sestavljajo vzorci iz doline reke Cetine in vzorci z otoka Hvara. V tej skupini smo odkrili tudi genetsko identična vzorca s Hvara (27, 30). V II. skupini so torej samo hrvaški vzorci (Hvar in dolina reke Cetine), kar kaže na neko skupno genetsko ozadje in genetsko ožji material. V III. samostojno skupino so vključeni le vzorci iz Črne gore (31, 32, 34, 35, 36, 37, 39, 40). Tudi v tem primeru gre očitno za genetsko podoben rastlinski material, kot pri vzorcih s Hvara in iz doline reke Cetine v skupini II. Vendar so v primerjavi s skupino II genetske razdalje v skupini III bistveno večje. Izračunan korelacijski koeficient med kofenetičnimi in Jaccardovimi vrednostmi je znašal 0,87. To pomeni, da gre za dobro ujemanje izvornih podatkov podobnosti z razporeditvijo v sorodnostne skupine.



**Slika 13:** Dendrogram UPGMA osnovan na podatkih RAPD in izračunu Jaccardovih koeficientov podobnosti 40-ih vzorčnih dreves fige.

Vzorci od 1 do 10 so iz slovenske Istre, od 11 do 20 iz doline reke Cetine, od 21 do 30 s Hvara, vzorci od 31 do 40 pa so iz Črne gore.

## 4.2 ANALIZA MIKROSATELITSKIH LOKUSOV

### 4.2.1 Karakterizacija mikrosatelitskih lokusov

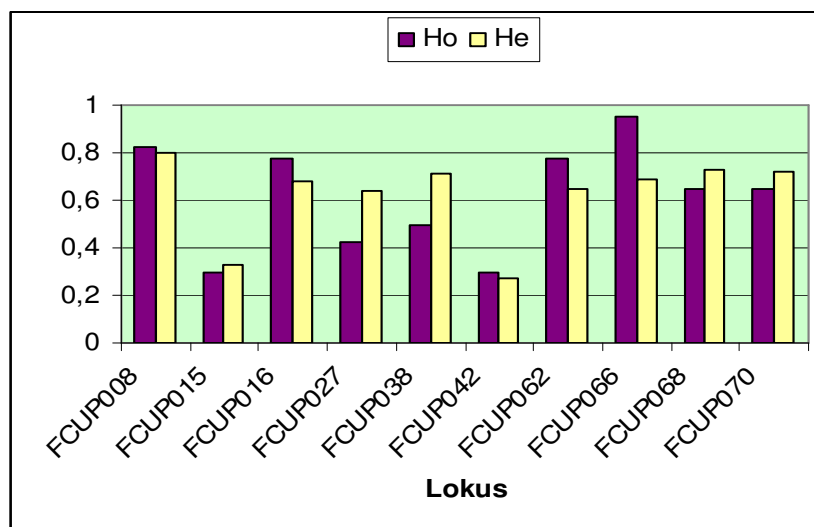
Z desetimi pari lokusno specifičnih začetnih oligonukleotidov smo pri 40-ih drevesih fig namnožili 62 polimorfni alelov. Najmanj alelov (3) smo odkrili na lokusu FCUP042, največ (10) pa na lokusu FCUP008. V povprečju se je na mikrosatelitski lokus namnožilo 6,2 alelov. Ker je informacijska vrednost lokusa odvisna tudi od frekvence alelov, smo izračunali še število efektivnih alelov. V našem primeru se je število efektivnih alelov razlikovalo od dejanskega števila namnoženih alelov in v povprečju znašalo 3,07 na lokus (preglednica 5).

**Preglednica 5:** Parametri genetske variabilnosti posameznih mikrosatelitskih lokusov 40-ih vzorčnih dreves fige.

Opažena ( $H_o$ ) in pričakovana ( $H_e$ ) heterozigotnost, število alelov ( $n$ ), število efektivnih alelov ( $n_e$ ), informacijska vrednost polimorfizma (PIC) in verjetnost enakosti genotipov (PI).

Lokus	$H_o$	$H_e$	$n$	$n_e$	PIC	PI
FCUP008	0,825	0,801	10	5,03	0,763	0,072
FCUP015	0,300	0,328	4	1,49	0,303	0,478
FCUP016	0,775	0,683	6	3,15	0,633	0,147
FCUP027	0,425	0,644	5	2,81	0,572	0,196
FCUP038	0,500	0,711	9	3,46	0,672	0,119
FCUP042	0,300	0,270	3	1,37	0,250	0,555
FCUP062	0,775	0,649	5	2,85	0,570	0,200
FCUP066	0,950	0,690	7	3,23	0,629	0,154
FCUP068	0,650	0,728	6	3,68	0,683	0,115
FCUP070	0,650	0,722	7	3,60	0,660	0,135
Povprečje	0,615	0,623	6,2	3,07	0,574	$3 \times 10^{-8}$ *

\*Zmnožek PI vrednosti vseh 10 mikrosatelitskih lokusov.



Slika 14: Opažena ( $H_o$ ) in pričakovana ( $H_e$ ) heterozigotnost po lokusih.

Vrednosti opažene heterozigotnosti ( $H_o$ ) so se nahajale na območju med 0,300 za lokusa FCUP015 in FCUP042 in vrednostjo 0,950 za lokus FCUP066. Na lokusih FCUP008, FCUP016, FCUP042, FCUP062 in FCUP066 je opažena heterozigotnost celo malenkost višja od pričakovane (Slika 14). Na lokusih FCUP015 in FCUP042 z najnižjo vrednostjo  $H_o$ , je bilo homozigotnih kar 28 genotipov. 23 homozigotnih genotipov smo opazili na lokusu FCUP027, 20 je bilo karakterističnih za lokus FCUP038, 14 za lokus FCUP068 in FCUP070, 9 za lokus FCUP016 in FCUP062 ter 7 za lokus FCUP008. Le dva homozigotna genotipa sta bila značilna za lokus FCUP066. Pričakovana heterozigotnost ( $H_e$ ) se je gibala med 0,270 za lokus FCUP042 in 0,801 za lokus FCUP008. Pričakovana heterozigotnost je bila pri polovici lokusov (FCUP015, FCUP027, FCUP038, FCUP068, FCUP070) višja od opažene heterozigotnosti, pri drugi polovici lokusov (FCUP008, FCUP016, FCUP042, FCUP062, FCUP066) pa nižja od opažene heterozigotnosti. Največjo razliko smo opazili na lokusu FCUP066 (0,26). Povprečje pričakovane heterozigotnosti je bilo 0,623 in je podobno povprečju opažene heterozigotnosti ( $H_o=0,615$ ) (Preglednica 5).

Za populacijo so statistično značilna odstopanja od Hardy-Weinbergovega ravnovesja na šestih lokusih (Preglednica 6): FCUP008, FCUP016, FCUP027, FCUP038, FCUP066 in FCUP070.

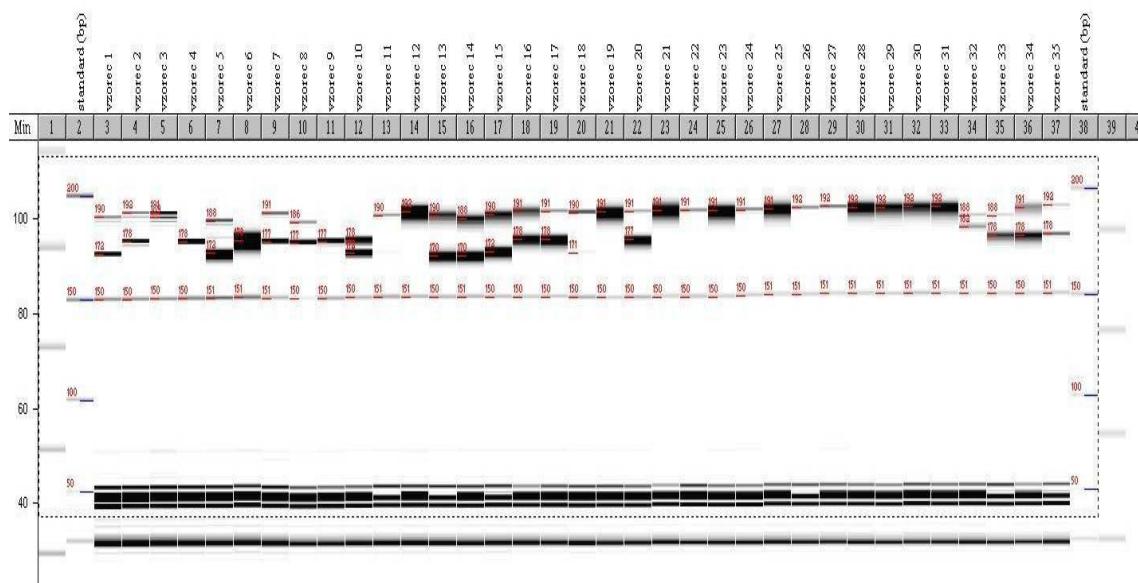
**Preglednica 6:** Opažena ( $H_o$ ) in pričakovana ( $H_e$ ) heterozigotnost ter Vrednost - P, izračunane v eksaktnem testu Hardy-Weinbergovega ravnovesja.

Lokus	$H_o$	$H_e$	Vrednost - P	S.D.
<b>FCUP008</b>	<b>0,825</b>	<b>0,801</b>	<b>0,0286</b>	<b>0,0070</b>
FCUP015	0,300	0,328	0,5265	0,0124
<b>FCUP016</b>	<b>0,775</b>	<b>0,683</b>	<b>0,0104</b>	<b>0,0019</b>
<b>FCUP027</b>	<b>0,425</b>	<b>0,644</b>	<b>0,0082</b>	<b>0,0021</b>
<b>FCUP038</b>	<b>0,500</b>	<b>0,711</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>
FCUP042	0,300	0,270	1,0000	0,0000
FCUP062	0,775	0,649	0,1562	0,0105
<b>FCUP066</b>	<b>0,950</b>	<b>0,690</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
FCUP068	0,650	0,728	0,0710	0,0710
<b>FCUP070</b>	<b>0,650</b>	<b>0,722</b>	<b>0,0012</b>	<b>0,0012</b>

\*Krepko zapisana so statistično značilna odstopanja  $H_o$  od  $H_e$  ( $P < 0,05$ ).

Pomemben parameter genetske raznolikosti je tudi informacijska vrednost polimorfizma (PIC), ki predstavlja informativnost posameznega mikrosatelitskega lokusa. Vrednosti PIC so izračunane iz frekvenc alelov in se uporabljajo kot merilo primernosti lokusa za gensko kartiranje. Najvišjo vrednost PIC ( $PIC=0,763$ ) smo odkrili pri lokusu FCUP008, najmanjšo ( $PIC=0,250$ ) pa pri lokusu FCUP042. 8 lokusov je imelo vrednosti PIC večje od 0,5, zato se uvrščajo med informativne lokuse. Lokusi z vrednostjo PIC nad 0,7 so primerni za gensko kartiranje. V naši analizi smo odkrili le 1 tak mikrosatelitski lokus.

Ocena verjetnosti enakosti genotipov (PI) nam prav tako pokaže kakšna je informativnost proučevanega lokusa. Višje vrednosti PI kažejo nizko informativnost lokusa. Verjetnost enakosti genotipov je bila najvišja pri lokusu FCUP042 ( $PI=0,555$ ), sledila sta mu lokusa FCUP015 ( $PI=0,478$ ) in FCUP062 ( $PI=0,200$ ). Večjo sposobnost razločevanja posameznikov lahko glede na najnižje vrednosti PI pričakujemo na lokusih FCUP038 ( $PI=0,119$ ), FCUP068 ( $PI=0,115$ ) in FCUP008 ( $PI=0,072$ ). Verjetnost, da bosta izbrana posameznika fig identična na vseh 10 mikrosatelitskih lokusih, je izredno majhna, saj bi za njuno odkritje morali pregledati  $7 \times 10^{10}$  posameznikov.



**Slika 15:** Elektroforegram mikrosatelitskega lokusa FCUP038 pri vzorcih fig.

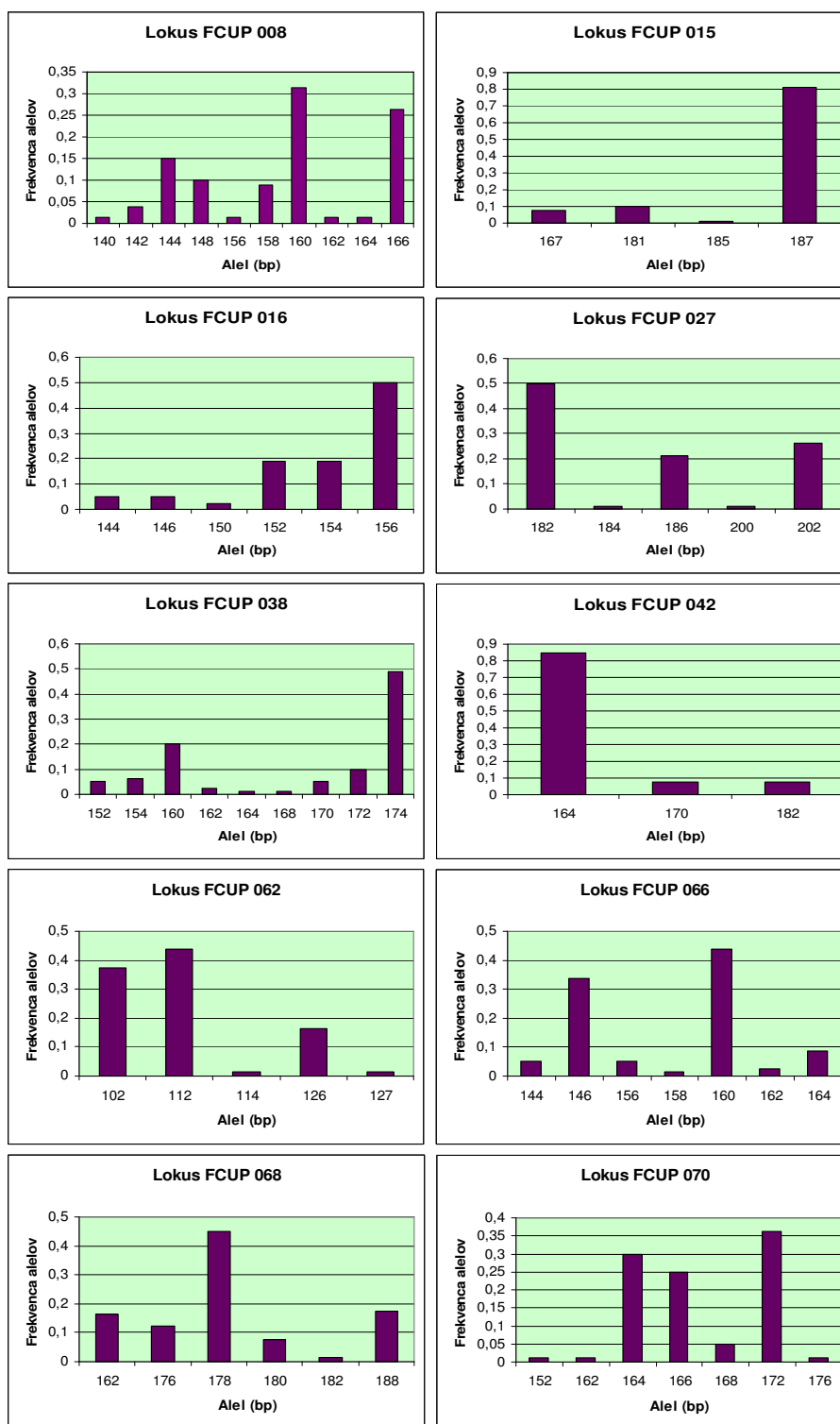
Vzorci fig so iz slovenske Istre (vzorci 1-10), iz doline reke Cetine (vzorci 11-20), s Hvara (vzorci 21-30) in Črne gore (vzorci 31-35). V 2. in 38. stezi je velikostni standard ALFexpress Sizer (50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 bp, Amersham Biosciences).

Alele na posameznem lokusu smo zaradi lažje genotipizacije vzorcev fig poimenovali s črko. Najkrajšemu alelu na lokusu smo pripisali črko A, naslednjemu smo dodelili B, itd. Najmanj alelov (3) je bilo odkritih na lokusu FCUP042, sledil mu je lokus FCUP015 s 4 aleli. 5 alelov smo zaznali na lokusih FCUP027 in FCUP062. Pri večini omenjenih lokusov je bil karakterističen po en alel z nekoliko višjo frekvenco. Na lokusu FCUP027 je alel A (182 bp) pri 40-ih vzorcih fig najpogosteje zastopan (50 %). Na lokusu FCUP062 je najpogostejši alel B (112 bp), ki je zastopan v 43,8 %. Najpogostejši alel lokusa FCUP015 je alel D (81,3 %). Najvišjo frekvenco smo opazili na lokusu FCUP042, kjer je alel A zastopan v 85 %, ostalih 15 % vrednosti pa je razporejenih med ostala 2 alela. Na tem lokusu je bilo nizko tudi število učinkovitih alelov (1,37). Nizko število učinkovitih alelov smo odkrili tudi na lokusu FCUP015 (1,49). Na ostalih lokusih so bile frekvence bolj enakomerno razporejene, kar se je odražalo tudi v večjem številu učinkovitih alelov na lokus. Frekvence posameznih alelov po lokusih so predstavljene v preglednici 6, v grafični obliki pa so podane na sliki 16.



**Preglednica 7:** Dolžina alelov (bp) in frekvenca alelov (v oklepaju) 40-ih vzorčnih dreves fige na 10 mikrosatelitskih lokusih.

Lokus	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
FCUP008	140 (0,013)	142 (0,038)	144 (0,150)	148 (0,100)	156 (0,013)	158 (0,088)	160 (0,313)	162 (0,013)	164 (0,013)	166 (0,263)
FCUP015	167 (0,075)	181 (0,100)	185 (0,013)	187 (0,813)	/	/	/	/	/	/
FCUP016	144 (0,050)	146 (0,050)	150 (0,025)	152 (0,188)	154 (0,188)	156 (0,500)	/	/	/	/
FCUP027	182 (0,500)	184 (0,013)	186 (0,213)	200 (0,013)	202 (0,263)	/	/	/	/	/
FCUP038	152 (0,050)	154 (0,063)	160 (0,200)	162 (0,025)	164 (0,013)	168 (0,013)	170 (0,050)	172 (0,100)	174 (0,488)	/
FCUP042	164 (0,850)	170 (0,075)	182 (0,075)	/	/	/	/	/	/	/
FCUP 062	102 (0,375)	112 (0,438)	114 (0,013)	126 (0,163)	127 (0,013)	/	/	/	/	/
FCUP066	144 (0,050)	146 (0,338)	156 (0,050)	158 (0,013)	160 (0,438)	162 (0,025)	164 (0,088)	/	/	/
FCUP068	162 (0,163)	176 (0,125)	178 (0,450)	180 (0,075)	182 (0,013)	188 (0,175)	/	/	/	/
FCUP070	152 (0,013)	162 (0,013)	164 (0,300)	166 (0,250)	168 (0,050)	172 (0,363)	176 (0,013)	/	/	/



Slika 16: Frekvence alelov posameznih lokusov.

Med 62 aleli smo odkrili 17 geografsko specifičnih alelov. Po en specifičen alel so imele vzorčne fige iz doline reke Cetine (3), iz Črne gore (2) in eno drevo fige iz slovenske Istre. Dva specifična alela smo odkrili pri dveh vzorcih iz Slovenske Istre in enemu iz Črne gore.

Trije specifični aleli pa so bili karakteristični le za eno drevo fige z otoka Hvara. Največ geografsko specifičnih alelov, kar štiri, smo odkrili na lokusu FCUP008. Glede obravnavanih območij, pa po številu geografsko specifičnih alelov izstopa Črna gora. Ugotovili smo jih šest. Pregled geografsko specifičnih alelov je predstavljen v preglednici 8.

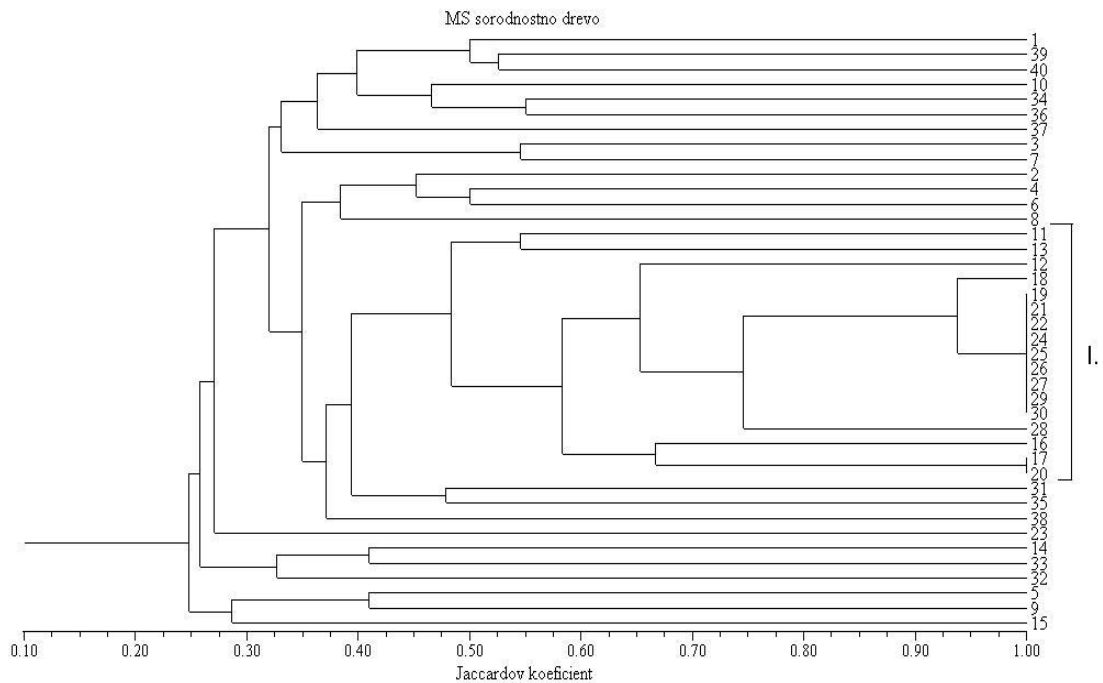
**Preglednica 8:** Geografsko specifični aleli.

Lokus	Alel		Lokacija (št. vzorca)
	Oznaka	Dolžina (bp)	
FCUP008	E	156	slovenska Istra (2)
FCUP008	A	140	slovenska Istra (8)
FCUP008	I	164	dolina reke Cetine (11)
FCUP008	H	162	dolina reke Cetine (15)
FCUP015	C	185	Črna gora (37)
FCUP027	B	184	dolina reke Cetine (16)
FCUP027	D	200	Črna gora (32)
FCUP038	F	168	slovenska Istra (8)
FCUP038	E	164	Črna gora (32)
FCUP038	D	162	Črna gora (38)
FCUP062	C	114	Hvar (23)
FCUP062	E	127	Črna gora (37)
FCUP066	D	158	Hvar (23)
FCUP068	E	182	Črna gora (34)
FCUP070	G	176	slovenska Istra (2)
FCUP070	A	152	slovenska Istra (9)
FCUP070	B	162	Hvar (23)

#### 4.2.2 Genetska podobnost fig-mikrosatelitski lokusi

Iz podatkov prisotnosti (1) ali odsotnosti (0) določenega alela pri posameznem vzorcu fige smo sestavili binarno matriko (priloga A2), ki smo jo uporabili kot osnovo za izračunavanje Jaccardovih koeficientov podobnosti med vzorčnimi drevesi fig (priloga B2). Iz Jaccardove matrike podobnostnih koeficientov smo z metodo UPGMA izdelali dendrogram (sorodnostno drevo), v katerem so bila vzorčna drevesa razvrščena v sorodnostne skupine (slika 17). V dendrogramu se jasno loči ena definirana skupina. V skupini so se pojavili le vzorci s Hvara in doline reke Cetine. Zanimivo je, da smo pri osmih vzorcih s Hvara (21, 22, 24, 25, 26, 27, 29, 30) in enem cetinskem vzorcu (19) odkrili identičen genetski mikrosatelitski profil. V skupini so torej ponovno samo hrvaški vzorci, kar kaže na veliko genetsko podobnost, ki smo jo opazili že pri sorodstvenem drevesu RAPD. Preostale skupine v drevesu so geografsko heterogene, z nižjimi koeficienti podobnosti. Izračunan korelacijski koeficient med kofenetičnimi in

Jaccardovimi vrednostmi je znašal 0,94. To pomeni, da se izvorni podatki podobnosti zelo dobro ujemajo z razporeditvijo v sorodnostne skupine.



**Slika 17:** Dendrogram UPGMA narejen na osnovi MS podatkov in Jaccardovih koeficientov genetske podobnosti med 40 vzorčnimi drevesi fig.

Vzorci od 1 do 10 so iz slovenske Istre, od 11 do 20 iz doline reke Cetine, od 21 do 30 s Hvara, vzorci od 31 do 40 pa so iz Črne gore.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Figa je značilna sredozemska vrsta, ki so jo namensko gojili že v neolitiku. Kasneje se je gojenje fig razširilo iz prvotnega območja gojenja, Sredozemlja, še na druge kontinente. Izredna regeneracijska sposobnost drevesa fige in enostavnost razmnoževanja z vegetativnimi deli sta prispevali k ohranjanju in pestrosti današnjih sort. Do razvoja molekularnih metod so za vrednotenje sort uporabljali morfološke značilnosti listov in plodov. Z vidika razprostranosti gojenja fige in posledično vpliva pedoklimatskih in agrotehničnih ukrepov morfološki znaki niso primerljivi. Razvoj molekularnih metod na nivoju DNA je doprinesel nove pristope vrednotenja genetskega materiala, popolnoma neodvisne od vplivov okolja. V naravi in agro-ekosistemih je zelo pomemben soobstoj divjih in gojenih fig. Nekateri genotipi fig potrebujejo za razvoj plodov kaprifikacijo in polinacijske osice, ki se razvijajo v divjih figah in oprahujejo gojena drevesa fig. V pričujočem delu smo predstavili uporabnost dveh različnih molekularnih metod za vrednotenje in upravljanje z genskimi viri fige.

### 5.1 ANALIZA NAMNOŽENIH FRAGMENTOV RAPD

Z enajstimi začetnimi oligonukleotidi serije A in X smo v verižni reakciji s polimerazo namnožili intenzivne in ponovljive fragmente RAPD. Pri 40-ih vzorcih fig, s štirih različnih območij, smo odkrili 87 fragmentov RAPD. Od tega je bilo 65 polimorfnih, kar predstavlja 74,4-odstotni polimorfizem. Povprečno število namnoženih fragmentov RAPD na začetni oligonukleotid je bilo 7,9, povprečno število polimorfnih pa 5,9. Ikegami in sod. (2008) so odkrili 71,5-odstotni polimorfizem namnoženih fragmentov RAPD, ko so analizirali 19 sort ekonomsko pomembnih gojenih fig z Azije in Evrope. O 72-odstotnem polimorfizmu fragmentov RAPD poročajo tudi Salhi-Hannachi in sod. (2005) v študiji 35 tunizijskih ekotipov iz treh različnih kolekcijских nasadov. Pri analizi 18 tunizijskih kultivarjev iz dveh kolekcijских nasadov pa so Salhi-Hannachi in sod. (2003) odkrili kar 85,1 odstotni polimorfizem. Na velikost polimorfizma fig lahko vpliva število predstavnikov posameznih geografskih območij, ki jih vključimo v molekularno analizo. Pomembna dejavnika pa sta tudi izbira začetnih oligonukleotidov in kriteriji vrednotenja namnoženih fragmentov RAPD. Ugotovljen polimorfizem divje fige je podoben polimorfizmu pri gojeni figi. Pri divji figi bi lahko sicer pričakovali večji polimorfizem, saj gre za spontane križance, medtem ko se gojene fige razmnožujejo klonsko in pri tem ne prihaja do hibridizacije dednine.

Naključno namnoženi fragmenti RAPD so se izkazali kot primerno orodje za ugotavljanje raznolikosti fig zaradi visokega polimorfizma. De Masi in sod. (2005) so prišli do zaključka, da so fragmenti RAPD primerni za razlikovanje kultivarjev fig in tudi za razlikovanje klonov istega kultivarja. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Cabrera in sod. (2005) ter Sadler in sod. (2005). Čeprav z molekularno metodo RAPD še ni bila opravljena molekularna analiza populacij divjih fig, je naša raziskava pokazala, da so

naključno namnoženi fragmenti RAPD primerno orodje tudi za proučevanje genetske raznolikosti divjih fig.

## 5.2 ANALIZA MIKROSATELITSKIH LOKUSOV

Z desetimi pari lokusno specifičnih začetnih oligonukleotidov smo pri 40-ih vzorčnih drevesih fig namnožili 62 polimorfni alelov. Povprečno število alelov na lokus je bilo 6,2. Tudi Khadari in sod. (2004) so pri analizi 54 kultivarjev in 8 kaprifig iz Maroka na 6 mikrosatelitskih lokusih odkrili podobno število alelov na lokus ( $n=6,3$ ). Ikegami in sod. (2008) so pri analizi 19 gojenih fig (iz Azije in Evrope) na 13 lokusih v povprečju zaznali 5,2 alela na lokus. O nekoliko manjši variabilnosti mikrosatelitov pa poročajo Giraldo in sod. (2008), ki so v analizo vključili 209 gojenih fig (196 iz različnih območij v Španiji, 13 iz drugih držav). Na 20 lokusih so v povprečju odkrili le 3,9 alelov. Giraldo in sod. (2005) poročajo še o manjšem povprečnem številu alelov na lokus ( $n=3$ ), ko so analizirali 15 kultivarjev fig (Turčija, Španija, Francija, Italija, Portugalska in Izrael) na 26 mikrosatelitskih lokusih. Pomembna dejavnika, ki vplivata na velikost polimorfizma fig sta genetska struktura analiziranih vzorcev in izbira mikrosatelitskih lokusov. Pri izbiri mikrosatelitskih lokusov se lahko namreč zgodi, da niso vsi dovolj polimorfni.

Opažena heterozigotnost ( $H_o$ ) je bila najnižja ( $H_o=0,300$ ) na lokusih FCUP015 in FCUP042, kjer smo na posameznem lokusu odkrili kar 28 homozigotnih genotipov. Najvišjo opaženo heterozigotnost ( $H_o=0,950$ ) smo opazili na lokusu FCUP066, kjer je bilo 38 genotipov heterozigotnih. V povprečju vseh lokusov je opažena heterozigotnost ( $H_o$ ) znašala 0,615, čeprav bi za divje fige pričakovali večjo heterozigotnost. Že Zohary in Spegel-Roy (1975) omenjata, da je za divje, spolno razmnoževane populacije fig značilna velika genetska variabilnost in da so gojeni kloni fig ekstremno heterozigotni. Pred domestikacijo so se rastline razmnoževale spontano s križanji. Zaradi tega je prišlo do povečanja heterozigotnosti, kar je rastlinam omogočilo preživetje. V določenem obdobju pa je generativno razmnoževanje prešlo v vegetativno in tako je heterozigotnost ostala fiksirana. Podobne ugotovitve so Sefc in sod. (2000b) predstavili pri vinski trti, ki skupaj s figo, oljko, dateljnovno palmo in granatnim jabolkom spada med prve sadne rastline, ki so jih gojili v »Starem svetu« (Zohary in Hopf, 2000). Tudi pričakovana heterozigotnost ( $H_e$ ), izračunana iz frekvenc alelov, ni bila visoka in je v povprečju znašala 0,623. Podobno povprečno vrednost  $H_e$  so odkrili tudi Khadari in sod. (2004) ( $H_e=0,60$ ) pri proučevanju maroških gojenih fig. O nekoliko manjši povprečni pričakovani heterozigotnosti pa poročajo Ikegami in sod. (2008) ( $H_e=0,44$ ), Giraldo in sod. (2005) ( $H_e=0,42$ ) in Giraldo in sod. (2008) ( $H_e=0,36$ ), pri proučevanju kultiviranih oblik fig. Povprečna opažena heterozigotnost ( $H_o=0,615$ ) je zelo podobna povprečni pričakovani heterozigotnosti ( $H_e=0,623$ ). Do podobnih rezultatov so v predhodnih študijah prišli Ikegami in sod. (2008), ki domnevajo, da je tovrsten rezultat posledica naključnega združevanja gamet. Kljub temu pa je imelo šest lokusov naše analize v celotni populaciji statistično značilno odstopanje od Hardy-Weinbergovega ravnovesja. Odstopanje je bilo še posebej izrazito na lokusu

FCUP066 ( $P = 0$ ). To kaže na možnost, da na populacijo vplivajo nekateri dejavniki, ki so zanj bolj ali manj ugodni. Ti dejavniki so lahko nenaključno združevanje gamet, premiki gamet (peloda) ali zigot (semen), mutacije ter naravna selekcija, ki favorizira določene alele. Teh odstopanj na preostalih štirih lokusih verjetno ne zaznamo, ker so učinki zgoraj naštetih dejavnikov na populacijo majhni.

Vrednosti PIC določajo vrednost polimorfizma, ki je odvisen od števila alelov in njihove frekvence na posameznem lokusu (Botstein in sod., 1980). Na osnovi povprečne vrednosti PIC ( $PIC=0,574$ ) lahko zaključimo, da so analizirani mikrosatelitski lokusi informativni. Med informativne ( $PIC > 0,5$ ) so se uvrstili vsi lokusi razen FCUP015 in FCUP042. Le lokus FCUP008 pa je izpolnjeval tudi kriterij o primernosti lokusa za kartiranje, saj spada med zelo informativne ( $PIC > 0,7$ ).

Izračunane frekvence alelov so bile sorazmerno nizke posebno na lokusih z večjim številom alelov. Enakomernejša razporeditev frekvenc alelov na lokusih FCUP008, FCUP016, FCUP038, FCUP066, FCUP068 in FCUP070 se je odražala tudi v višjem številu učinkovitih alelov. Na lokusih z manjšim številom alelov (FCUP015, FCUP027, FCUP042 in FCUP062) so bile frekvence nekaterih alelov nekoliko višje. Zaradi visoke frekvence enega alela na omenjenih lokusih, so bile nižje tudi vrednosti izračunanih učinkovitih alelov. Število alelov na posameznem lokusu lahko vpliva tudi na število opaženih genotipov, ki jih določa alelna kombinacija. Genotipizacija je ključnega pomena pri identifikaciji posameznikov, hkrati pa omogoča vpogled v dednino predvsem pri študijah genetske sorodnosti. Verjetnost enakosti genotipov PI, se uporablja kot merilo ločevanja genotipov in je pokazala nizko informacijsko vrednost lokusov FCUP015, FCUP042 in FCUP062. Pri omenjenih lokusih so bile vrednosti PI višje, zato jih uvrščamo med mikrosatelitske lokuse s slabšo sposobnostjo ločevanja. Visoke vrednosti PI pripisujemo manjšemu številu odkritih alelov na lokus. Ti lokusi torej niso primerni za identifikacijo.

V splošnem je opaziti korelacijo med številom alelov in kombinacijo alelov, ki določajo genotip z izračunano vrednostjo PI. Pri večjem številu alelov na lokus lahko pričakujemo več kombinacij, ki bodo določale genotip in s tem nižje vrednosti PI oz. večjo sposobnost ločevanja med posamezniki. Največjo sposobnost ločevanja posameznikov smo odkrili pri lokusu FCUP008, kjer je bila vrednost PI najnižja ( $PI=0,072$ ). Na tem lokusu smo odkrili 10 različnih alelov in največ učinkovitih alelov ( $n_e=5,03$ ). Dobro sposobnost ločevanja posameznikov sta imela tudi lokusa FCUP068 ( $PI=0,115$ ) in FCUP038 z vrednostjo PI 0,119.

Če povzamemo, smo najboljše parametre variabilnosti odkrili na lokusih FCUP008, FCUP038 in FCUP068, ki imajo visoke vrednosti PIC in najnižje vrednosti PI ter največ učinkovitih alelov. Zaradi naštetih lastnosti jih lahko uvrstimo med mikrosatelitske lokuse z visoko informacijsko vrednostjo. Najslabše parametre variabilnosti pa imajo lokusi FCUP015, FCUP042 in FCUP062, zaradi nizkih vrednosti PIC in visokih vrednosti PI in majhnega števila učinkovitih alelov.

Z desetimi pari lokusno specifičnih začetnih oligonukleotidov smo pri 40-ih vzorčnih drevesih fig namnožili tudi 17 t.i. geografsko specifičnih alelov. Ti so še posebej pomembni pri identifikaciji sort. Največ geografsko specifičnih alelov, in sicer 6, smo odkrili pri vzorcih iz Črne gore, ki so se v dendrogramu RAPD razvrstili v jasno definirano skupino, in 5 pri vzorcih iz slovenske Istre. Pri vzorcih s Hvara in doline reke Cetine pa smo ugotovili po 3 geografsko specifične alele, kar kaže na podobnost hrvaških fig, ki smo jo razbrali tudi iz dendrogramov.

Visok polimorfizem uporabljenih mikrosatelitskih lokusov je omogočil razmeroma dobro ločevanje med vsemi analiziranimi vzorci fig. Na osnovi obravnavanih parametrov variabilnosti lahko zaključimo, da so mikrosatelitski lokusi dobro in primerno orodje za identifikacijo genotipov fig. V primerjavi z drugimi ekonomsko pomembnimi sredozemskimi vrstami je pri figah dostopnih relativno malo mikrosatelitskih lokusov. Zato je zelo pomemben razvoj 15-ih novih začetnih oligonukleotidov pri figi (Bandelj in sod. 2007), ki smo jih tudi mi uporabili v naši analizi. Na osnovi analize genetske variabilnosti z 10 mikrosatelitskimi lokusi, smo ugotovili, da so za proučevanje genetske variabilnosti divjih fig najprimernejši lokusi FCUP008, FCUP016, FCUP027, FCUP038, FCUP066, FCUP068 in FCUP070. Novi začetni oligonukleotidi ne pomenijo le orodja za populacijske in ekološke študije. Zelo primerni so tudi za natančno in hitro razločevanje genotipov.

### 5.3 GENETSKA PODOBNOST FIG

Ocene genetske podobnosti 40-ih vzorčnih dreves fig, vzorčenih na štirih različnih območjih, smo z dvema molekularnima metodama za razlikovanje genetske raznolikosti dobili na osnovi prisotnosti ali odsotnosti določenega fragmenta pri posameznem genotipu in izdelane binarne matrike. Za določitev genetskih odnosov smo uporabili Jaccardov koeficient podobnosti, izračunan za posamezne pare vzorcev. Jaccardov koeficient je zelo primeren za ocenjevanje genetskih razdalj dominantnih fragmentov. Osnovan je namreč na izračunu deleža skupnih fragmentov dveh posameznikov. Za izdelavo dendrogramov smo v nadaljevanju izbrali metodo UPGMA, ki je najpogosteje uporabljena za filogenetske rekonstrukcije (Lowe in sod., 2004).

Vrednosti Jaccardovih koeficientov podobnosti, izračunanih na osnovi prisotnosti ali odsotnosti 87 namnoženih fragmentov RAPD, so bile v območju od 0,48 za genetsko najbolj oddaljene vzorce do 1,00 za vzorca, ki sta imela identične vse namnožene fragmente RAPD (vzorec s Hvara in vzorec iz Črne gore). Višje koeficiente podobnosti smo ugotovili pri vzorcih s Hvara in doline reke Cetine, ki se jim pridružuje še vzorec iz Črne gore. Zelo podobna sta si bila dva cetinska vzorca (18, 19) in dva vzorca s Hvara (22, 26) z Jaccardovim koeficientom podobnosti 0,97. Vzorca 27 in 30 iz doline reke Cetine pa nismo uspeli razločiti. Povprečje vseh vrednosti je bilo 0,666. Tako razpon kot tudi povprečje izračunanih vrednosti podobnostnih koeficientov so primerljivi z vrednostmi v



študijah gojenih fig z namnoženimi fragmenti RAPD (De Masi in sod., 2005; Khadari in sod., 1994). Sadler in sod. (2005) ter Salhi-Hannachi in sod. (2005) pa so pri študijah fig z namnoženimi fragmenti RAPD ugotovili nekoliko nižje vrednosti podobnostnih koeficientov (povprečje 0,39), saj so v analizo vključili gojene in divje fige. Pri mikrosatelitskih lokusih smo ugotovili nižje koeficiente podobnosti (povprečje 0,38). Vrednosti Jaccardovih koeficientov so bile v območju od 0,094 za genetsko najbolj oddaljena vzorca (vzorec 6 iz slovenske Istre in vzorec 32 iz Črne gore), do 1,00 za vzorce, ki so imeli identičen genetski profil (2 vzorca s Hvara in 8 vzorcev iz doline reke Cetine). O znatno višjem povprečju koeficientov podobnosti pri študijah gojenih fig z mikrosatelitskimi lokusi poročajo Giraldo in sod. (2005) (0,68) in Salhi-Hannachi in sod. (2003) (0,50). Analizirali so ožji genetski material, saj so izbrali le nekaj genotipov, ki se jih goji. Nižje vrednosti koeficientov podobnosti, ki smo jih ugotovili pri divjih figah, lahko razložimo s tem, da je šlo za geografsko ločene populacije. Zaradi tega lahko pričakujemo manjšo podobnost, ki pa je lahko tudi posledica spontanega križanja divjih fig.

Razporeditev vzorčnih fig v sorodnostne skupine z metodo UPGMA je bila z dvema molekularnima metodama za raziskovanje genetske raznolikosti različna. Pri konstrukciji sorodnostnega drevesa, iz rezultatov analize RAPD, so se analizirani vzorci fig razvrstili v tri večje skupine. Pri analizi mikrosatelitskih lokusov pa smo v sorodnostnem drevesu dobili jasno definirano le eno skupino. V obeh sorodnostnih drevesih so se vzorci s Hvara in doline reke Cetine uvrstili v eno samostojno, dobro definirano skupino. Gre torej za hrvaške vzorce, kar kaže veliko genetsko podobnost in ožji genetski material cetinskih in hvaranskih fig. Vendar pa bi med cetinskimi in otoškimi vzorci s Hvara pričakovali večjo raznolikost, saj je otok Hvar ločen od kopnega, dolino reke Cetine pa obdaja gorovje Biokovo. V dendrogramu RAPD smo ugotovili še eno jasno skupino, v kateri se nahajajo le črnogorske fige. Tudi v tem primeru gre očitno za genetsko podoben rastlinski material, podobno kot smo ugotovili pri hrvaških vzorcih, le da so genetske razdalje pri vzorcih fig iz Črne gore bistveno večje. Tudi Salhi-Hannachi in sod. (2005) so pri analizi dveh kolekcij tunizijskih kultivarjev fig, ki sta bili med sabo oddaljeni 300 km, ugotovili visoke vrednosti podobnosti. Avtorji menijo, da podobnosti ne moremo povezati s polinarsko osico šiškarico. Mobilnost osice šiškarice je zelo majhna in preprečuje genski pretok med tako oddaljenima regijama. Vendar pa tamkajšnji kmetje opozarjajo na ptiče, ki jedo fige in nato z iztrebki prenašajo seme na bolj oddaljena območja. S tem pojavom bi lahko utemeljili visoke vrednosti podobnosti. Druga možna razlaga, ki jo navajajo avtorji pa je, da so se genotipi fig pomešali zaradi človeka, ki se je v preteklosti veliko selil.

Različnost mikrosatelitskega sorodnostnega drevesa in sorodnostnega drevesa RAPD je lahko tudi posledica različne narave omenjenih molekularnih metod. Z metodo RAPD smo proučevali več ključnih regij v genomu, in sicer 87, z mikrosatelitnimi lokusi pa le 10 regij, ki vsebujejo mikrosatelit. Torej smo z metodo RAPD analizirali bistveno večji del genoma.

Na osnovi rezultatov združevanja vzorcev v podobnostne skupine lahko zaključimo, da sta obe opisani metodi za ugotavljanje genetske raznolikosti primerni za študije sorodnostnih odnosov in rekonstrukcijo širjenja genotipov fig. Z metodo RAPD smo odkrili večjo genetsko podobnost med vzorci fig iz Črne gore, kar pri mikrosatelitskih lokusih ni bilo izrazito. Z obema metodama pa smo ugotovili dobro genetsko povezanost med hrvaškimi figami (vzorci fig s Hvara in doline reke Cetine).

Znani so podatki genotipizacije za gojene sorte fig slovenske in hrvaške Istre (Bandelj in sod., 2007). Podatke smo primerjali z rezultati dobljenimi v naši nalogi in skušali ugotoviti ali se divje populacije fig znatno razlikujejo od gojenih fig. Le pri dveh lokusih (FCUP042 in FCUP068) se je pri divjih in gojenih figah namnožilo enako število alelov, in sicer 6. Pri ostalih 8 analiziranih lokusih pa se je pri divjih figah namnožilo več alelov. Največje odstopanje smo ugotovili pri lokusu FCUP038 (4 aleli več). Pri lokusih FCUP008 in FCUP066 pa so se namnožili 3 aleli več. Večjo podobnost pri gojenih figah lahko razložimo s klonskim razmnoževanjem, s čimer se ohranja enak genetski material. Za divje populacije fig pa so značilna spontana križanja in s tem večja pestrost genetskega materiala.

## 6 POVZETEK

Figa (*Ficus carica* L.) je sadna rastlina Sredozemlja, ki je bila namensko gojena celo pred pšenico (Kislev in sod., 2006). Včasih je imela gojena figa večji gospodarski pomen kot danes. Zanimanje zanjo se veča, saj je zelo rodno drevo, sadeži pa so privlačni zaradi eksotičnosti, vsebnosti vlaknin in številnih hranilnih snovi z zdravilnimi učinki. Vedno bolj je tudi zanimiva naravi prijazna pridelava, ki je značilna za gojeno figo, saj nima gospodarsko pomembnejših boleznih in škodljivcev (Vrhovnik in Prgomet, 2008).

Informacije o sortah in populacijah fig so v literaturi zelo skromne. Osnovane so predvsem na fenotipskih opisih znakov, ki pa zaradi razprostranosti gojenja običajno niso primerljivi. Nejasna so tudi razmerja med gojenimi in divjimi figami, čeprav je v naravnih in agro-ekosistemih zelo pomemben soobstoj obeh oblik. Nekateri genotipi fig potrebujejo za razvoj sadežev kaprifikacijo (način opravešavanja) in osico šiškario (*Blastophaga psenes* L.), ki opravešuje cvetove znotraj sikonija (Jousselin in sod., 2003).

Danes se za proučevanje genetske variabilnosti uporabljajo molekularne metode, s katerimi se opazujejo razlike med genomi, neodvisno od okoljskih dejavnikov. Molekularne metode za ugotavljanje genetske raznolikosti, ki so v zadnjih dvajsetih letih postopoma zamenjale klasične morfološke znake, se umeščajo v številne genetske raziskave rastlin, kot so: genotipiziranje posameznikov, identifikacija sort in klonov, preverjanje pristnosti sadilnega materiala v drevesnicah, rekonstrukcija zgodovine domestikacije rastlin, izvor in širjenje rastlin, avtohtonost sort.

Za učinkovito izvajanje molekularnih raziskav je potrebno med razpoložljivimi molekularnimi metodami izbrati tiste, ki so visoko informativne. Do razvoja mikrosatelitov fige v Franciji leta 2001 (Khadari in sod., 2001) in v Španiji leta 2005 (Giraldo in sod., 2005), so bili namnoženi fragmenti RAPD najpogosteje uporabljeni za proučevanje genoma fige. V naši raziskavi smo namnožene fragmente RAPD uporabili za proučevanje genetske variabilnosti divjih fig vzhodne jadranske regije. Genomsko DNA 40-ih vzorčnih fig smo izolirali po uveljavljenem protokolu (Kump in sod., 1992). V PCR smo z enajstimi začetnimi oligonukleotidi serije A in X namnožili 87 fragmentov RAPD, ki smo jih ločili s horizontalno agarozno elektroforezo. 65 fragmentov RAPD je bilo polimorfnih, kar predstavlja 74,4 % polimorfizem. Povprečno število namnoženih fragmentov RAPD na začetni oligonukleotid je bilo 7,9, povprečno število polimorfnih pa 5,9.

Enak rastlinski material smo analizirali še z mikrosatelitskimi lokusi. Protokol namnoževanja mikrosatelitov smo povzeli po avtorjih Bandelj in sod. (2007), fluorescentno zaznavanje pa smo opravili na avtomatizirani laserski napravi ALFexpress. Pri 40-ih vzorčnih figah smo z 10 mikrosatelitskimi lokusi namnožili 62 polimorfnih alelov s povprečjem 6,2 alela in informacijsko vrednostjo polimorfizma 0,574 na lokus. Najboljše parametre variabilnosti in visoko informacijsko vrednost smo odkrili na lokusih FCUP008, FCUP038 in FCUP068, ki imajo visoke vrednosti PIC in najnižje vrednosti PI ter največ

efektivnih alelov. Najslabše parametre variabilnosti pa imajo lokusi FCUP015, FCUP042 in FCUP062, zaradi nizkih vrednosti PIC in visokih vrednosti PI in majhnega števila efektivnih alelov. Opažena heterozigotnost ( $H_o$ ) je bila najnižja ( $H_o=0,300$ ) na lokusih FCUP015 in FCUP042 in najvišja ( $H_o=0,950$ ) na lokusu FCUP066. V povprečju sta bili opažena heterozigotnost ( $H_o=0,615$ ) in pričakovana heterozigotnost ( $H_e=0,623$ ) nižji, kot bi pričakovali za divje fige, ki se razmnožujejo s spontanim križanjem. Šest lokusov naše analize v celotni populaciji je imelo statistično značilno odstopanje od Hardy-Weinbergovega ravnovesja. Odstopanje je bilo še posebej izrazito na lokusu FCUP066 ( $P = 0$ ). To kaže na možnost, da na populacijo vplivajo nekateri dejavniki, ki so zanj bolj ali manj ugodni. Ti dejavniki so lahko nenaključno združevanje gamet, premiki gamet (peloda) ali zigot (semen), mutacije ter naravna selekcija, ki favorizira določene alele. Teh odstopanj na preostalih štirih lokusih verjetno ne zaznamo, ker so učinki zgoraj naštetih dejavnikov na populacijo majhni. Na osnovi vrednosti PIC so se med informativne ( $PIC > 0,5$ ) uvrstili vsi lokusi razen FCUP015 in FCUP042. Le lokus FCUP008 pa je izpolnjeval tudi kriterij o primernosti lokusa za kartiranje, saj spada med zelo informativne ( $PIC > 0,7$ ).

Na osnovi odkritega polimorfizma 40-ih vzorčnih fig z dvema metodama za raziskovanje genetske raznolikosti ugotavljamo, da je genetski material fig z različnih območij raznolik. Ocene genetske podobnosti 40-ih vzorčnih fig smo z dvema molekularnima metodama dobili na osnovi prisotnosti ali odsotnosti določenega fragmenta pri posameznem genotipu in izračunih Jaccardovih koeficientov podobnosti. Razporeditev vzorčnih fig v sorodnostne skupine z metodo UPGMA je bila z obema metodama različna. V obeh sorodnostnih drevesih so se vzorci s Hvara in doline reke Cetine uvrstili v eno samostojno, dobro definirano skupino. Gre torej za hrvaške vzorce, kar kaže na genetsko podobnost in ožji genetski material. Vendar pa bi med cetinskimi in hvaranskimi vzorci pričakovali večjo raznolikost, saj je otok Hvar ločen od kopnega, dolino reke Cetine pa obdaja gorovje Biokovo. V sorodnostnem drevesu RAPD smo ugotovili še eno jasno skupino, v kateri se nahajajo le črnogorske fige. Tudi v tem primeru gre očitno za genetsko podoben rastlinski material, kot smo ugotovili pri hrvaških vzorcih, le da so genetske razdalje pri vzorcih fig iz Črne gore bistveno večje. Različnost mikrosatelitskega sorodnostnega drevesa in sorodnostnega drevesa RAPD je lahko tudi posledica različne narave uporabljenih molekularnih metod. Z metodo RAPD smo proučevali več naključnih regij v genomu, in sicer 87, z mikrosatelitskimi lokusi pa le 10 regij, ki vsebujejo mikrosatelit. Torej smo z metodo RAPD analizirali bistveno večji del genoma.

Kljub temu, da z metodo RAPD še ni bila opravljena molekularna analiza populacij divjih fig, je naša raziskava pokazala, da so namnoženi fragmenti RAPD primerno orodje tudi za proučevanje genetske raznolikosti divjih fig. Na osnovi analize genetske variabilnosti z 10 mikrosatelitskimi lokusi smo ugotovili, da so za proučevanje genetske variabilnosti divjih fig najprimernejši lokusi FCUP008, FCUP016, FCUP027, FCUP038, FCUP066, FCUP068 in FCUP070.

## 7 VIRI

- 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., Schlötter C. (eds.). Oxford University press, Oxford: 24-33
- Armstrong W.P. 2001. Waynes' word: <http://waynesword.palomar.edu/wayne.htm>
- Bandelj D., Javornik B., Jakše J. 2007. Development of microsatellite markers in the common fig, *Ficus carica* L. *Molecular Ecology Notes*, 7: 1311-1314
- Bandelj D., Jakše J., Javornik B. 2008. Razvoj molekulskih orodij za identifikacijo sort fig v Istri. V: *Figa (Ficus carica L.) v Istri. Morfološke, molekulske in nekatere kemijske značilnosti*. Koper, Založba Annales: 84-89
- Bohanec B. 2008. Karakteristike žlahtnjenja fig in biotehniški pristopi razmnoževanja. V: *Figa (Ficus carica L.) v Istri. Morfološke, molekulske in nekatere kemijske značilnosti*. Koper, Založba Annales: 76-83
- Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. 1980. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32: 314-331
- Brus R. 2004. Drevesne vrste na Slovenskem. Ljubljana, Mladinska knjiga: 186 str.
- Cabrita L. F., Aksoy U., Hepaksoy S., Leitao J. M. 2000. Suitability of isozyme, RAPD and AFLP markers to assess genetic differences and relatedness among fig (*Ficus carica* L.) clones. *Scientia Horticulturae*, 87: 261-273
- Caetano-Anollés G., Bassam B.J., Gresshoff P.M. 1991. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio/Technology*, 9: 553-557
- Chambers G.K., MacAvoy E.S. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology part B*, 126: 455-576
- Chistiakov D.A., Hellemans B., Volckaert F.A.M. 2005. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*, 25 (5): 1-29
- De Masi L., Castaldo D., Galano G., Minasi P., Laratta B. 2005. Genotyping of fig (*Ficus carica* L.) via RAPD markers. *Science of Food and Agriculture*, 85: 2235-2242
- Edwards K.J., Mogg R. 2001. Plant Genotyping by Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms. V: *Plant Genotyping. The DNA Fingerprinting of Plants*. Henry R.J. (ed.). CAB International, UK: 1-13
- Eisen J.A. 1999. Mechanistic basis for microsatellite instability. V: *Microsatellites: Evolution and Applications*. Goldstein D.B., Schlötterer C. (eds.). Oxford, Oxford University Press: 34-48
- Estoup A., Angers B. 1998. Microsatellites and minisatellites for Molecular Ecology: Theoretical and Empirical Considerations. *Advances in Molecular Ecology* G.R. Carvalho (Ed.) IOS Press: 55-86
- Freeland J.R. 2005. *Molecular ecology*. John Wiley & Sons, Ltd.

- Giraldo E., Viruel M.A., Lopez-Correlas M., Hormaza J.I. 2005. Characterisation and cross-species transferability of microsatellites in the common fig (*Ficus carica* L.). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 80: 217-224
- Giraldo E., Lopez-Correlas M., Hormaza J.I. 2008. Optimization of the Management of an Ex-situ Germplasm Bank in Common Fig with SSRs. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 133: 69-77
- Goodman S. 1998. Patterns of extensive genetic differentiation and variation among European harbor seals (*Phoca vitulina vitulina*) revealed using microsatellite DNA polymorphisms. *Molecular Biology and Evolution*, 15 (2): 104-118
- Griffiths A.J.F., Wessler S.R., Lewontin R.C., Carrol S.B. 2008. Introduction to genetic analysis. New York, W.H. Freeman and Company: 613-615 str.
- Hancock J.M. 1999. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. V: *Microsatellites: Evolution and Applications*. Goldstein D.B., Schlötterer C. (eds.). Oxford, Oxford University Press: 1-9
- Huang W.G., Cipriani G., Morgante M., Testolin R. 1998. Microsatellite DNA in *Actinidia chinensis*: isolation, characterisation, and homology in related species. *Theoretical Applied Genetics*, 97: 1269-1278
- <http://www.omisinfo.com/omis/omis-nature/cetina-river.htm> (22.8.2009)
- Ikegami H., Nogata H., Hirashima K., Awamura M., Nakahara T. 2008. Analysis of genetic diversity among European and Asian fig varieties using ISSR, RAPD, and SSR markers (*Ficus carica* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56: 201-209
- Jarne P., Lagoda P.J.L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 424-429
- Jones C.J., Edwards K.J., Castaglione S., Winfield M.O., Sala F., van de Wiel C., Bredemeijer G., Vosman B., Matthes M., Daly A., Brettschneider R., Bettini P., Buiatti M., Maestri E., Malcevski A., Marmioli N., Aert R., Volckaert G., Rueda J., Linacero R., Vazquez A., Karp A. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding*, 3: 381-390
- Jousselin E., Rasplus J.-Y., Kjellberg F. 2003. Convergence and co-evolution in a mutualism: evidence from a molecular phylogeny of *Ficus*. *Evolution*, 57: 97-109
- Karp A., Edwards K.J. 1995. Molecular techniques in the analysis of the extant and distribution of genetics diversity. V: *Molecular genetic techniques for plant genetic resources*. Ayad W.G., Hodgkin T., Jaradat A., Rao V.R. (eds.). Report of an IPGRI Workshop, 9-11 October, Rome, Italy: 11-22
- Kashi Y., Soller M. Functional roles of microsatellites and minisatellites. V: *Microsatellites: Evolution and Applications*. Goldstein D.B., Schlötterer C. (eds.). Oxford, Oxford University Press: 10-23
- Khadari B., Lashermes Ph., Kjellberg F. 1994. RAPD fingerprints for identification and genetic characterization of fig (*Ficus carica* L.) genotypes. *J. Genet. & Breed.*, 49: 77-86

- Khadari B., Hochu I., Santoni S., Kjellberg F. 2001. Identification and characterization of microsatellite loci in the common fig (*Ficus carica* L.) and representative species of the genus *Ficus*. *Molecular Ecology Notes*, 3: 191
- Khadari B., Grout C., Santoni S., Kjellberg F. 2003. Contrasted genetic diversity and differentiation among Mediterranean populations of *Ficus carica* L.: A study using mtDNA RFLP. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52: 97-109
- Khadari B., Oukabli A., Ater M., Mamouni A., Roger J.P., Kjellberg F. 2004. Molecular Characterization of Moroccan Fig Germplasm Using Intersimple Sequence Repeat and Simple Sequence Repeat Markers To Establish A Reference Collection. *HortScience*, 40: 29-32
- King D.G., Soller M., Kashi Y. 1997. Evolutionary tuning knobs. *Endeavour*, 21: 36-40
- Kislev M.E., Hartmann A., Bar-Yosef O. 2006. Early domesticated fig in the Jordan Valley. *Science*, 312: 1372-1374
- Kump B., Svetek S., Javornik B. 1992. Izolacija visokomolekularne DNK iz rastlinskih tkiv. *Zbornik Biotehniške fakultete. Univerza v Ljubljani*, 59: 63-66
- Lowe A., Harris S., Ashton P. 2004. Genetic diversity and differentiation. V: *Ecological Genetics: Design, Analysis, and Application*. Oxford, Blackwell Publishing Company: 52-105
- MacPherson J.M., Eckstein P.E., Scoles G.J., Gajadhar A.A. 1993. Variability of the random amplified polymorphic DNA assay among thermal cyclers, and effect of primer and DNA concentration. *Molecular Cell Probes*, 7: 293-299
- Marshall T.C., Slate J., Kruuk L., Pemberton J.M. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7: 639-655
- Martinčič A., Sušnik F. 1984. Mala flora Slovenije: praprotnice in semenke. Ljubljana, Državna založba Slovenije: 229 str.
- Metzgar D., Bytof J., Wills C. 2000. Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. *Genome Research*, 10: 72-80
- Minch, E. 1997. Microsat, Version 1.5b: Stanford University Medical center, Stanford
- Morgante M., Olivieri A.M. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal*, 3: 175-182
- Morgante M., Rafalski A., Biddle P., Tingey S., Olivieri A.M. 1994. Genetic mapping and variability of seven soybean simple sequence repeat loci. *Genome*, 37: 763-769
- Morgante M., Hanafey M., Powell W. 2002. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetative DNA in plant genomes. *Nature Genetics*, 30: 194-200
- Mundani J. Fig mosaic virus.  
<http://www.jardin-mundani.com/images0/mosaic-virus-fig-tree8> (22.8.2009)
- Nei M., 1987. Genetic distance and molecular phylogeny. V: N. Ryman, and F. Utter (Eds.), *Population genetics and fishery management*. Seattle, University of Washington Press: 193-223
- Noort S., Rasplus J.Y. 2004.  
[http://www.figweb.org/Fig\\_wasps/Agonidae/Blastophaga/Blastophaga\\_psenes/htm](http://www.figweb.org/Fig_wasps/Agonidae/Blastophaga/Blastophaga_psenes/htm). (22.8.2009)

- Ogrin D. 1995. Podnebje slovenske Istre. Koper, Zgodovinsko društvo za južno Primorsko: 263 str.
- Paetkau D., Calvert W., Stirling I., Strobeck C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology*, 4: 347-354
- Paran I., Michelmore R. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical Applied Genetics*, 85: 985-993
- Peakall R., Gilmore S., Keys W., Morgante M., Rafalski A. 1998. Cross species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: Implications for the transferability of SSRs in plants. *Molecular Biology and Evolution*, 15: 1275-1287
- Pogačnik V. 2006. (1.9.2009).  
[http://www.common.wikimwdia.org/wiki/File:Hvar\\_J\\_obala.jpg](http://www.common.wikimwdia.org/wiki/File:Hvar_J_obala.jpg) (22.8.2009)
- Rafalski J.A., Tingey V. 1993. Genetic diagnosis in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends in Genetics*, 9: 275-280
- Raymond M., Roussel F. 2008. (25.9.2009)  
<http://kimura.univ-montp2.fr/~rousset/Genepop.htm> (19.10.2009)
- Rohlf F.J. 1998. NTSYS: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.02. Applied Biostatistics Inc., Setauket, New York (programska oprema)
- Sadder M. T., Ateyyeh A. F. 2005. Molecular assessment of polymorphism among local Jordanian genotypes of the common fig (*Ficus carica* L.). *Scientia Horticulturae*, 107: 347-351
- Salhi-Hannachi A., Chatti K., Mars M., Marrakchi M., Trifi M. 2003. Comparative analysis of genetic diversity in two Tunisian collections of fig cultivars based on random amplified polymorphic DNA and inter simple sequence repeats fingerprints. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52: 563-573
- Salhi-Hannachi A., Chatti K., Saddoud O., Mars M., Rhouma A., Marrakchi M., Trifi M. 2005. Genetic diversity of different Tunisian fig (*Ficus carica* L.) collections revealed by RAPD fingerprints. *Hereditas*, 143: 15-22
- Schlötterer C. 1998. Microsatellites. V: Molecular Genetics Analysis of Populations: A Practical Approach. Hoelzel A.R. (ed.). Oxford, IRL Press: 237-261
- Schlötterer C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109: 365-371
- Sefc K.M., Lopes M.S., Lefort F., Botta R., Roubelakis-Angelakis K.A., Ibáñez J., Pejić I., Wagner H.W., Glössl J., Steinkellner H. 2000b. Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivars. *Theoretical Applied Genetics*, 100: 498-505
- Sharma A., Namdeo A.G., Mahadik K.R. 2008. Molecular Markers: New Prospects in Plant Genome Analysis. *Pharmacognosy Reviews*, 2 (3): 23-34
- Stover E., Aradhya M. 2007. The Fig: Overview of an Ancient Fruit. *HortScience*, 42 (5): 1083-1087



- Toth G., Gaspari Z., Jurka J. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*, 10: 967-981
- Vinson J. A. 1999. The Functional Food Properties of Figs. *Cereal foods world*, 44 (2): 82-87
- Vrhovnik I., Prgomet Ž. 2008. Uvod. V: Figa (*Ficus carica* L.) v Istri. Morfološke, molekulske in nekatere kemijske značilnosti. *Koper, Založba Annales*: 7-8
- Wagner H.W., Sefc K.M. 1999. IDENTITY 1.0. Centre for Applied Genetics, University of Agricultural Sciences Vienna (programska oprema)
- Wang Z., Weber J.L. Zhong G., Tanksley S.D. 1994. Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theoretical Applied Genetics*, 88: 1-6
- Welsh J., McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18: 7213-7218
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V., 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535
- You-Chun L., Korol A.B., Fahima T., Beiles A., Nevo E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review *Molecular Ecology* 11: 2453–2465
- Yu K., Pauls K.P. 1992. Optimization of the PCR program for RAPD analysis. *Nucleic Acids Research*, 20: 2606
- Zohary D., Hopf M. 2000. Fruit trees and nuts. V: *Domestication of Plants in the Old World*. 3rd edition. Oxford, Oxford University Press: 159-164
- Zohary D., Spiegel-Roy P. 1975. Beginnings of fruit growing in the Old World. *Science*, 187: 319-327
- Zupančič I. 1998. Genetski detektivi: prepoznavanje oseb in preverjanje sorodstvenih povezav s pomočjo preiskave DNA. *Proteus*, 60: 400-405

## ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Dunji Bandelj Mavsar za spremljanje mojega dela, za strokovne nasvete pri praktičnem delu in napotke pri pisanju diplomske naloge ter za mnenja in popravke.

Zahvaljujem se doc. dr. Dunji Bandelj Mavsar za uporabo laboratorija na Inštitutu za sredozemsko kmetijstvo in oljkarstvo ter Irmi Tomažič za tehnično pomoč v laboratoriju.

Hvala predsednici doc. dr. Marjanci Starčič Erjavec in recenzentu prof. dr. Petru Trontlju za strokovno oceno diplomskega dela.

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

Hvala doc. dr. Jerneju Jakšetu za tehnično pomoč in strokovna mnenja.

Prisrčna hvala staršema za zgled in finančno podporo. Hvala Neviu za potrpežljivost in spodbudo. Hvala mami Sonji za lektoriranje diplomskega dela.

Hvala Mici za gostoljubna prenočišča in taxi službo ter za spodbudne besede in dobro voljo.

Hvala vsem!

## **PRILOGE**













<b>FCUP027</b>																																							
182	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1		
184	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
186	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1		
200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0		
202	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<b>FCUP038</b>																																							
152	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	
154	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
160	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	
162	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
164	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
168	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
170	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
172	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
174	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
<b>FCUP042</b>																																							
164	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
170	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
182	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
<b>FCUP062</b>																																							
102	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	
112	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	
114	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
126	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	
127	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0





