

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE
UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM BIODIVERZITETA

Špela Božič

**PREGLED IN IDENTIFIKACIJA SADILNIH MEST OLJK V
NACIONALNEM KOLEKCIJSKEM NASADU STRUNJAN Z
MOLEKULSKIMI MARKERJI**

Zaključna naloga
(Mentor: dr. Dunja Bandelj)

Koper, študijsko leto 2010/2011

KAZALO VSEBINE

1. UVOD.....	8
1.1 Kolekcijski nasadi in genske banke.....	8
2. PREGLED OBJAV	12
2.1 Diverziteta oljk.....	12
2.2 Morfologija oljke.....	13
2.2.1 Koreninski sistem.....	13
2.2.2 Deblo	13
2.2.3 Krošnja in veje	13
2.2.4 Listi	14
2.2.5 Brsti.....	14
2.2.6 Socvetje	14
2.2.7 Plod	14
2.3 Izvor in domestikacija oljk	14
2.4 Pomen oljkarstva in glavne pridelovalne regije.....	15
2.5 Oljkarstvo v Sloveniji.....	16
2.6 Sorte v Sloveniji.....	16
2.6.1 Sorta "Istrska belica"	17
2.6.2 Sorta "Leccino"	17
2.7 Molekulski markerji	18
2.8 Predstavitev markerskega sistema RAPD	20
2.9 Uporaba markerjev RAPD pri upravljanju kolekcijskih nasadov.....	21
3. MATERIALI IN METODE DE LA	24
3.1 Rastlinski material.....	24
3.2 Izolacija celokupne DNA	25
3.3 Merjenje koncentracije DNA.....	26
3.4 Namnoževanje fragmentov RAPD.....	26

5. REZULTATI Z DISKUSIJO	29
5.1 Primerjava profilov RAPD med drevesi znotraj sort	29
6. ZAKLJUČEK.....	32
7. VIRI:	34

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Klasifikacija molekulkih markerjev (<i>Spooner in sod., 2005</i>)	20
Preglednica 2: Ime sort in število analiziranih dreves v nacionalnem kolekcijskem nasadu Strunjan	25
Preglednica 3: Nukleotidna zaporedja uporabljenih začetnih oligonukleotidov	27
Preglednica 4: Seznam začetnih oligonukleotidov, največje in najmanjše število namnoženih markerjev ter povprečje namnoženih markerjev	29
Preglednica 5: Primerjava števila namnoženih markerjev z različnimi začetnimi oligonukleotidi pri sortah v nacionalnem kolekcijskem nasadu Strunjan	31

KAZALO SLIK

Slika 1: Razvrščanje oljčnega olja v maloprodaji (Vesel in sod., 2009)	9
Slika 2: Sorta "Istrska belica" (Foto: Špela Božič).....	17
Slika 3: Sorta "Leccino" (Foto: Špela Božič).....	18
Slika 4: Nacionalni kolekcijski nasad Strunjan (Foto: Špela Božič).....	24
Slika 5: Na agaroznem gelu ločeni produkti reakcije PCR z začetnim oligonukleotidom OPX-08 pri 48 vzorcih oljk (1. del)	28
Slika 6: Na agaroznem gelu ločeni produkti reakcije PCR z začetnim oligonukleotidom OPX-08 pri 48 vzorcih oljk (2. del)	28

POVZETEK

Gojenje oljk za namene pridobivanja olja je danes razširjeno že po vsem svetu. Iz prvotnega območja pridelave, Sredozemlja, se je razširilo tudi na ameriški, afriški ter avstralski kontinent. Skupno tako danes gojimo več kot 1200 različnih sort oljk. Ta izjemna pestrost je posledica dobre regeneracijske sposobnosti oljke ter uspešnega vegetativnega razmnoževanja.

V Sloveniji oljko gojimo v Slovenski Istri, najdemo pa jo tudi na Goriškem ter v Vipavski dolini in v Goriških Brdih. Razvoj oljkarstva v Sloveniji se je začel v 4 stoletju pr. n. št., v letu 2008/2009 pa so pridelovalci v Slovenski Istri pridelali kar 500 ton ekstra deviškega oljčnega olja. Med najpogostejšimi sortami, ki uspevajo pri nas, sta Istrska belica in Leccino.

V preteklosti je identifikacija sort temeljila na opisu lastnosti posamezne rastline, danes pa so v uporabi različni molekulski markerji. Za optimizacijo pridelave je potrebna sistematična preučitev obstoječih genskih virov oljke. V ta namen v različnih državah ustanavljajo nacionalne ali mednarodne kolekcijske nasade, ali pa obstoječe genske vire vključujejo v zbirke velikih genskih bank, ki so razširjene po celem svetu.

V analizo je bilo vključenih 21 sort iz nacionalnega kolekcijskega nasada Strunjan. Za pomnoževanje DNA smo uporabili 5 začetnih oligonukleotidov serije OPX in OPA, pri analizi pa smo upoštevali le dobro pomožene in razločne markerje. Največ markerjev RAPD je bilo namnoženih z začetnim oligonukleotidom OPX-03, najmanj pa z začetnim oligonukleotidom OPA-08. Tako smo pri 20-ih analiziranih sortah odkrili enakost profilov z vsemi petimi začetnimi oligonukleotidi. Pri sorti buga pa smo pri petem drevesu (Bu5) odkrili različen vzorec razporeditve markerjev.

ABSTRACT

Today, olive tree growing for the purposes of oil production is spread all over the world. From the Mediterranean as the original area of cultivation it spread to the American, African and Australian continents. As a result, more than 1200 different olive tree species are grown at present. Such an outstanding variety results from the olive tree strong regenerative ability as well as its vegetative reproduction.

In Slovenia, olive tree is grown primarily in the Slovene Istria. It grows also in the Gorica area, in Vipava valley and in Collio Goriziano. Olive oil production started around 400 BC, in the year 2008/2009 500 tons of extra virgin olive oil have been produced by the Slovene Istria growers. The most common species grown are 'Istrska belica' and 'Leccino'.

In the past, species identification was made based on the description of individual plants, whereas today various molecular markers are used. Growth optimization can be made provided a systematic analysis of the olive tree existing genetic sources is made. For this purpose many countries started national or international plantations for the collection of olive tree species or contribute the existing genetic sources data to collections of large data banks all over the world.

In our analysis 21 species from the Strunjan collection plantation were analysed. DNA multiplication was performed by means of 5 initial oligonucleotides series OPX and OPA. Only clear markers that multiplied successfully were included in the analysis. Most of RAPD markers were multiplied by the initial oligonucleotide OPX-03, least were multiplied by oligonucleotide OPA-08. In 20 species analysed the same profile containing all five initial oligonucleotides was observed. In Buga species, a different pattern in marker distribution was observed in the plant number five (Bu5).

1. UVOD

1.1 Kolekcijski nasadi in genske banke

Z namenom preučevanja genetske raznolikosti oljke ter odkrivanja najprimernejših genotipov, ki bodo poleg dobre prilagojenosti tehnologijam intenzivnega oljkarstva zagotovili še kakovosten pridelek, so v številnih državah ustanovili kolekcijske nasade. V njih so zbrane sorte določenega območja. V procesih izboljšanja rastlinskega materiala oljke so največji problem nezadovoljivi in pomanjkljivi podatki o lastnostih sort ali agronomsko pomembnih lastnosti sort in sortne značilnosti oljčnega olja. Zaradi tega je za optimizacijo pridelave nujno potrebna sistematična preučitev obstoječih genskih virov oljke (*Bandelj in sod., 2002*).

Danes gojimo več kot 1200 različnih sort, ki so del nacionalnih ali mednarodnih kolekcijskih nasadov. V teh nasadih lahko najdemo okrog 4200 različnih genotipov (*Bartolini in sod., 1998*). Prepoznavanje določene sorte je oteženo predvsem zaradi dejavnikov okolja, kjer določeni genotipi rastejo, zaradi majhne znotraj-sortne genetske razdalje ter zaradi prisotnosti asimptomatskih virusov, ki lahko vplivajo na rastlinski fenotip (*Baldoni in Belaj, 2009*).

V kolekcijskih nasadih poteka sistematično vrednotenje lastnosti oljčnega olja posameznih ter agronomsko zanimivih lastnosti sort. Na osnovi večletnih opazovanj se ocenjuje genetski potencial dreves in izvednoti vpliv okolja na posamezne lastnosti. To je nujno potrebno pred začetkom uresničevanja programov izboljšanja rastlinskega materiala (*Bandelj in sod., 2002*).

Bandelj in sod. (2002) navajajo, da so pomembnejše agronomske lastnosti, ki jih vrednotijo v kolekcijskih nasadih, sledeče: rodnost, bujnost dreves, čas cvetenja, dolžina mladostnega obdobja, odpornost na bolezni in škodljivce ter tolerantnost na stresne dejavnike, kot so slana tla, suša, nizke temperature itd. Pomembna lastnost je tudi oljevitost sorte. Vsebnost olja, izražena v suhi snovi, je odvisna od posameznega genotipa oz. sorte, teža plodu pa od okolja.

Kakovost olja posameznih sort v kolekcijah določajo z analitskimi in senzoričnimi metodami. Te analize vključujejo sestavo in razmerje maščobnih kislin ter parametre antioksidativnih lastnosti olja. Pri tem se ocenjuje tako hranilna kot komercialna vrednost olja (*Bandelj in sod., 2002*). Razvrščanje oljčnega olja je odvisno od načina predelave in kakovosti

pridelanega olja. Tako lahko glede na način predelave ločimo olja iz oljčnih tropin, rafinirana olja ter deviška oljčna olja. Rafinirano olje dobimo s kemijsko obdelavo plodov (rafinacija), olje iz oljčnih tropin pa z ekstrakcijo s topili. Deviško oljčno olje je pridobljeno iz ploda oljke z mehanskimi ali drugimi fizikalnimi sredstvi, ki ne povzročajo sprememb olja. Glede na kakovost in tehnologijo predelave so na tržišču lahko prisotne le naslednje kategorije oljčnega olja (*Vesel in sod., 2009*):



Slika : Razvrščanje oljčnega olja v maloprodaji (*Vesel in sod., 2009*)

Klub temu da je oljka genetsko bogata, oljkarji še nimajo na voljo sort, ki bi popolnoma ustrezale zahtevam intenzivnega oljkarstva. Klonska selekcija je bila glavna dejavnost, ki je pripeljala do izboljšanja lastnosti obstoječih sort (*Bandelj in sod., 2002*). Do nedavnega so genetsko variabilnost *O.europaea* preučevali in opisovali predvsem z morfološkimi deskriptorji. Z razvojem molekulskih markerjev pa so le-ti postali glavno orodje pri proučevanju in opisovanju genetske variabilnosti oljke (*Baldoni in Belaj, 2009*).

V letih 1970 in 1980 je bilo ob spoznanju, da grozi genska erozija, veliko napora vloženega v zbiranje rastlinskih genskih virov. Ti podatki so danes del velikih zbirk genskih bank (približno šest milijonov vzorcev, FAO, 1998). Genske banke pomagajo ohranjati genski material ter pripomorejo k ohranjanju biotske pestrosti v kmetijstvu. V njih se shranjuje genski material kmetijskih rastlin ter njihovih divjih prednikov (*Engels in Visser, 2003*). V

nobenem primeru pa ne smemo dopustiti, da bi genske banke nadomestile tradicionalne metode ohranjanja genskih virov (*de Vicente in Andersson, 2006*).

Med najpomembnejše svetovne zbirke rastlinskega genskega materiala uvrščamo (*de Vicente in Andersson, 2006*):

- Kraljevi botanični vrt Kew v Veliki Britaniji, v katerem se nahaja največja zbirka reprezentativnih vzorcev DNK vseh rastlinskih družin (ang. Royal Botanic Gardens, Kew, United Kingdom),
- Missouri botanični vrt v Združenih državah Amerike ima zbirko 20.000 vzorcev rastlinskih tkiv, namenjenih za raziskave ohranjanja rastlinskih vrst (ang. US Missouri Botanical Garden),
- Avstralska genska banka Univerze Southern Cross ohranja genetske informacije celotne avstralske flore (ang. The Australian Plant DNA Bank),
- DNA banka v Nacionalnem botaničnem inštitutu v Kirstenboschu, Južna Afrika, ohranja genetski material južnoafriške flore (ang. The DNA bank at the Leslie Hill Molecular Systematics Laboratory of the National Botanical Institute in Kirstenbosch, South Africa).

Poleg omenjenih bank obstaja tudi veliko zasebnih zbirk. Njihovo delovanje, bi morali uskladiti z delovanjem velikih genskih bank, saj bi le tako omogočili ohranitev genetskih informacij za prihodnje generacije (*de Vicente in Andersson, 2006*).

V genskih bankah, so posamezni genski viri razdeljeni v določene kategorije. Med njimi so (*Engels in Visser, 2003*):

- genski viri z znanimi lastnostmi,
- genski viri, ki predstavljajo široko paleto genetske raznolikosti,
- divji sorodniki gojenih rastlin,
- starejše populacije,
- populacije, ki se običajno uporabljajo za razvoj novih sort,
- ogrožene populacije.

Številni dejavniki urejajo vrsto genskih virov, ki jih je mogoče hraniti v genskih bankah. Nekateri so strožji, podrejeni zahtevam politike, drugi pa se nanašajo na določitev prednostnih nalog upravljavca banke (*Engels in Visser, 2003*).

Genske banke imajo pomembno vlogo pri ohranjanju biotske pestrosti, saj zagotavljajo lažji dostop do materialov za molekularne raziskave. Prav tako pa tudi ohranjajo genetske informacije za raziskave v prihodnosti. Predstavljajo nekakšno zavarovalno polico, na kateri se zagotovi, da se celoten obseg podatkov o vrsti ali rastlinski družini ne izgubi, potem ko leta izumre (*Ryder in sod., 2000*).

Cilji zaključne naloge so:

- predstavitev markerskih sistemov,
- izvesti genotipizacijo oljčnih sort na sadilnih mestih v nacionalnem kolekcijskem nasadu Strunjan za pravilno upravljanje kolekcije.

2. PREGLED OBJAV

2.1 Diverziteta oljk

Oljko uvrščamo v družino *Oleaceae*, ki zajema približno 25 rodov s 600 različnimi vrstami. Predstavnike te vrste najdemo na vseh kontinentih, razen na Antarktiki. Med 25 rodovi družine *Oleaceae* so nekateri ekonomsko pomembni, med njimi je najbolj pomembna oljka (*Olea europaea* L.), ki jo gojimo kot sadno vrsto za pridobivanje olja in plodov. Rodovi *Jasminum*, *Syringa*, *Ligustrum* in *Forsythia* se gojijo kot okrasne rastline, vrste rodu *Fraxinus* pa se uporabljajo za pridobivanje lesa. *Wallander in Albert* (2000) sta v svoji klasifikaciji družino *Oleaceae* razdelila v dve poddružini, *Jasminoideae* in *Oleoideae*. Oljka pripada rodu *Olea*, ki je razdeljen v dva podrodova: *Olea* in *Paniculata*. Podrod *Olea* pa se nato deli še v dve skupini: *Olea in Ligustroides*. *Green in Wickens* (1989) v svojem članku navajata, da skupina *Olea* vključuje *O. europaea* kompleks, ki je glede na morfološke karakteristike razdeljen na 6 podvrst.

Vsaka podvrsta je značilna za določeno geografsko območje (*Doveri in Baldoni, 2007*):

- podvrsta *europaea* je poznana kot sredozemska oljka (oleaster (divja) in sativa (kultivirana) oljka),
- podvrsta *cuspidata* se razpostrira na območju od severovzhodne Azije do Kitajske, najdemo pa ja tudi na Arabskem polotoku ter na vzhodnem in južnem delu Afrike,
- podvrsta *laperrinei* uspeva v saharskem gorovju,
- podvrsta *maroccana* je endemična na območju Maroka,
- podvrsta *cerasiformis* je endemična na otoku Madeira,
- podvrsta *guanchica* je poznana na Kanarskih otokih.

2.2 Morfologija oljke

Poznamo divjjo (*Olea europaea oleaster*) in gojeno (*Olea europaea sativa*) oljko. Divja ima manjše liste in plodove ter trnaste veje. Je tipična sredozemska rastlina, ki je dobro prilagojena na sušna in topla poletja. Zaradi dobre zmožnosti obnavljanja oljka lahko doseže starost nekaj stoletij do tisočletij. Gojena oblika ima eno ali več debel, ki lahko v višino zrastejo tudi do 15 metrov (*Bučar-Miklavčič in sod., 1997*).

2.2.1 Koreninski sistem

Razvoj koreninskega sistema je odvisen od načina razmnoževanja, oljka je lahko razmnožena vegetativno (z delom rastline) ali generativno (iz semena). Pri vegetativno razmnoženih oljkah je koreninski sistem bolj površinski. Ta se po nastanku hiperplazij (grč) obnavlja iz nadomestnih brstov. Generativno razmnožene oljke pa imajo močno glavno (primarno) korenino, ki prodira v prst. Kasneje, v času nastajanja hiperplazij, pa se razvije sekundarni koreninski sistem, ki nadomesti primarno korenino (*Bučar-Miklavčič in sod., 1997*).

2.2.2 Deblo

Mlado drevo ima okroglo deblo, ki se v starosti spremeni v deblo nepravilnih oblik, na njem pa lahko vidimo odebelitve – grče. Prav tako lahko pri starejših drevesih opazimo rebra, ki potekajo od korenin do ogrodnih vej. V starem deblu se velikokrat naselijo glive, ki povzročijo propad notranjosti debla. Ob propadanju notranjosti pa na obodu poganjajo mladi poganjki, ki nadomestijo staro deblo. Zaradi tega pravimo, da je oljka trdoživa, saj je večina starih dreves v notranjosti votla, obdajajo pa jih poganjki, ki obrastejo votlo propadlo deblo (*Vesel in sod., 2009*).

2.2.3 Krošnja in veje

Skelet drevesa je zgrajen iz primarnih (ogrodnih) in sekundarnih vej. Primarne veje izraščajo neposredno iz debla, sekundarne pa izraščajo iz primarnih in so tako lahko različne starosti. Razvejanost drevesa oblikuje krošnjo, način rasti pa je odvisen od sorte. Rast je tako lahko izrazito pokončna ali povešena (*Bučar-Miklavčič in sod., 1997*).

2.2.4 Listi

Oljka je zimzeleno drevo z enostavnimi listi, ki so eliptične podolgovate oblike in imajo kratek pecelj. Na drevesu se listi obdržijo tri leta. Spodnja stran lista je srebrno siva, zgornja pa je bleščeče zelene barve (*Vesel in sod., 2009*).

2.2.5 Brsti

Brste delimo v rastne (vegetativne) in cvetne (generativne), najdemo pa jih lahko na ogrodnem deblu in vejah, na enoletnih poganjkih ali na mlajših in starejših vejah. Glede na lego lahko ločimo stranske (rastni ali cvetni brsti), terminalne (rastni brsti) in nadomestne (nevidne) brste ter podbrste (speči brsti) (*Vesel in sod., 2009*).

2.2.6 Socvetje

Socvetja (združeni cvetovi) se razvijejo iz zalistnih poganjkov prejšnjega leta, vanje je lahko vključenih od 10 do 45 cvetov. Oljka je vetrocvetka, njeni cvetovi so dvospolni, s pestičem in nadraslo plodnico. Čas cvetenja je odvisen od sorte in podnebnih razmer, kljub obilnemu cvetenju pa se iz stotih plodov razvije samo eden ali do štirje plodovi. Nekatere sorte niso samoplodne, zato v take nasade dodajamo sorte, ki so dobre opraševalke (*Vesel in sod., 2009*).

2.2.7 Plod

Plod je sestavljen iz povrhnjice (epikarpa), mesa (mezokarpa), koščice (endokarpa) in semena. Lahko je različnih oblik in velikosti, odvisno od razmer, v katerih raste, ter od sorte. Povrhnjica med dozorevanjem spreminja barvo od zeleno-rumene do črne ali temno vijolične. Čas in način barvanja plodov sta odvisna od vremenskih razmer, agrotehnike v nasadu, naloženosti drevesa ter od sorte. Plodovi so grenkega okusa zaradi glukoze oleuropeina, ki se nahaja v njih (*Vesel in sod., 2009*).

2.3 Izvor in domestikacija oljk

Zaradi slabe zgodovinske dokumentacije o poreklu in razdrobljenih informacijah o oljčni paleobotaniki ne moremo dokončno ugotoviti pravega izvora oljke, vendar se v zadnjih letih pojavljajo številne hipoteze. Ena izmed hipotez pravi, da izvira oljčno drevo iz Afrike, z območja današnjega Egipta in Etiopije, kjer naj bi najprej začeli načrtno gojiti oljke. Oljčne

vejice in cvetno-oljne venčke so našli v Tutankamonovem grobu, prav tako so v Egiptu našli prve zapise o gojenju oljk, ki segajo v 1580 pr. n. št. Oljkarstvo v Egiptu naj bi doživelo razcvet v času Ramzesa II. (1197–1165 pr. n. št), kmalu zatem pa naj bi število oljčnikov začelo upadati, uničeni naj bi bili vsi nasadi, posamezne sadike pa naj bi prenesli do južnih obal Krete (*Vesel in sod., 2009*).

Watts in sod. (1996) ter Carrion in Dupré (1996) so s pomočjo arheoloških, paleontoloških in antropoloških dokazov ugotovili prisotnost posameznih sort oljk v obdobju zadnje poledenitve (1800 pr. n. št.) v vzhodnih in zahodnih mediteranskih regijah. Belaj in sod. (2002) ter Besnard in sod. (2001) so v svojih študijah raziskovali možnost domestikacije oljke proti zahodu v povezavi s človeškimi migracijami. Nedavni dokazi pa so pokazali, da se je domestikacija začela spontano na obeh straneh Sredozemlja (*Lumaret in sod., 2004; Breton in sod., 2006*). Dokončni datum začetka domestikacije pa so z analizami oljčnih fosilov postavili na konec bakrene dobe v severozahodnem delu Sredozemlja (*Terral 2000, Terral in sod., 2004, Rodriguez-Ariza in Montes Moya 2005*).

2.4 Pomen oljkarstva in glavne pridelovalne regije

Oljka se je z razvojem pomorstva nezadržno širila vse do petega stoletja našega štetja. Nato se je širjenje ustavilo in se spet nadaljevalo ob ponovnem razcvetu pomorskih držav. Med 12. in 16. stoletjem so trgovino z oljem nadzirali Benečani. Po odkritju Amerike se je oljka razširila tudi na tistem območju, predvsem v Kaliforniji, Argentini in Čilu. Vrhunec predelave oljk je prišel v devetnajstem stoletju; oljno olje je bilo takrat temeljna prehrambna in energijska surovina.

Danes je oljka (*Olea europaea* L.) druga najpomembnejša oljčnica, katere gojenje se razprostira na 8 milijonih hektarjev površine, največji delež je skoncentriran na območju Sredozemlja. Med največje proizvajalke oljnega olja štejemo Španijo, Italijo in Grčijo (*Baldoni in Belaj, 2009*). Oljka pa uspeva tudi na Hrvaškem, na Cipru, v Črni Gori, Jordaniji, Libanonu, Izraelu, Libiji, Argentini, Združenih državah Amerike, Čilu, Mehiki, Peruju in Avstraliji (*Vesel in sod., 2009*).

2.5 Oljkarstvo v Sloveniji

V Sloveniji gojimo oljko v Slovenski Istri (obalno območje do Kraškega roba), najdemo pa jo lahko tudi na Goriškem ter v Vipavski dolini in v Goriških Brdih. Oljkarstvo se je v Slovenski Istri začelo v 4. stoletju pr. n. št., ko so oljko na to ozemlje vnesli grški kolonizatorji. Večji razvoj je doživelo v času Rimljanov, ko je oljkarstvo veljalo za uveljavljeno kmetijsko panogo. V času Beneške republike in kasneje pod francosko vladavino so olje uporabljali za proizvodnjo mila in za razsvetljavo. Proti koncu 19. stoletja je v Slovenski Istri uspevalo približno 320 tisoč dreves (*Vesel in sod., 2009*).

Današnja prisotnost in podobo oljke v Sloveniji so oblikovale gospodarsko-politične razmere ter slabe letine in pozebe v letih 1604, 1763, 1782, 1789, 1887, 1914, 1929, 1956, 1985 ter 1996. Po pozebi leta 1956 se je spremenila sortna sestava oljk v Sloveniji, prevladovati je začela sorta "Istrska belica". Pozeba je vodila tudi do pomanjkanja sadilnega materiala, zato so začeli uvažati sadike sort iz sosednje Italije, predvsem »Leccino, Frantoio in Pendolino«. Tako so v letu 2008/2009 pridelovalci v Slovenski Istri na 1.620 hektarih oljčnikov, posajenih s 350 tisoč oljkami, pridelali in predelali 500 ton ekstra deviškega oljčnega olja (*Vesel in sod., 2009*).

2.6 Sorte v Sloveniji

Za ohranjanje genetske raznovrstnosti je zelo pomembno opisovanje in zbiranje različnih sort oljk. Tega se je zavedal tudi profesor Adamič, ki je leta 1982 predstavil sorte, rastoče v Sloveniji. Podatke o sortah je skupaj z več raziskovalci zbiral od leta 1953 do 1977. Med takrat predstavljenimi sortami lahko najdemo Bugo, Črnico, Boise, Istrsko belico, Drobnico, Štorto in številne druge. Zbiranje starih in neznanih sort se je nadaljevalo po pozebi leta 1985. Prvi kolekcijski nasad, ki je v zasebni lasti, smo v Sloveniji dobili leta 1995, in od takrat naprej v njem zbiramo in opisujemo sorte, prisotne v Sloveniji. Najpomembnejši sorti med njimi sta Istrska belica in Leccino (*Vesel in sod., 2009*).

2.6.1 Sorta "Istrska belica"

Poznamo jo tudi pod imeni "Belica", "Žlahtna belica", "Bianchera". Njenega točnega izvora ne poznamo, po nekaterih podatkih naj bi izhajala iz Boljunca (zaledje Trsta, Italija). Prepoznamo jo po pokončni in metlasti rasti ter po poznejšem vstopu v rodnost. Njeni plodovi so srednje debeli, ob obiranju svetlo zelene barve. To sorto gojimo predvsem za pridobivanje olja, ki je po okusu grenko in pikantno (*Vesel in sod., 2009*).



Slika : Sorta "Istrska belica" (Foto: Špela Božič)

2.6.2 Sorta "Leccino"

Je toskanska (italijanska) sorta, ki se je močno razširila v Sloveniji. Najdemo je predvsem v intenzivnih nasadih, sajenih od osemdesetih let dalje. Drevo je odprte, srednje bujne rasti. Plodovi so tako kot pri Istrski belici srednje debeli, vendar se le-ti ob dozorevanju obarvajo skoraj črno. "Leccino" je sorta, ki dobro prenaša nizke zimske temperature. Olje je v primerjavi z oljem sorte "Istrska belica" bolj harmonično in sladko, vendar ima krajšo življenjsko dobo (*Vesel in sod., 2009*).



Slika : Sorta "Leccino" (Foto: Špela Božič)

2.7 Molekulski markerji

Identifikacija oljk je v preteklosti temeljila na opisih lastnosti rastline: ploda, lista, vejice, socvetja in endokarpa. Ti znaki pa so odvisni od okolja, v katerem rastlina raste, ekspresije genov ter od razvojnega obdobja rastline, zato niso izboljšali oziroma rešili problema identifikacije. Sledil je razvoj izoencimskih biokemičnih markerjev. Marker je katerokoli zaporedje DNA, ki ga lahko brez težav odkrijemo in spremljamo njegovo dedovanje (*Bandelj in sod., 2002*). Izoencimi so alelene oblike encimov, ki jih kodirajo strukturni geni. Encime sestavljajo beljakovine z aminokislinami, ki so lahko električno nabiti. Govorimo lahko o neto električnem naboju, ki nastane pri vezavi določene aminokislina na beljakovino. Ko pride do mutacije v molekuli DNA, se neto električni naboj spremeni. Ta sprememba povzroči spremembo v obliki molekule. Spremembe oblike molekule in spremembe električnega naboja lahko opazujemo z elektroforezo na agaroznem gelu. Izoencimski molekulski markerji so zelo preprosti za uporabo, tehnika je hitra, saj se zanjo ne potrebuje izolirane DNA. Največja slabost izoencimskega markerskega sistema je njegova nizka stopnja polimorfizma. Poleg tega pa izoencimski markerji predstavljajo fenotipske lastnosti, na katere vpliva okolje.

Tako se na primer lahko pridobljen profil iz izoencimskih markejev spreminja glede na vrsto tkiva uporabljenega v analizi. V enem tkivu se namreč lahko izražajo geni, ki jih v drugem tkivu ni zaznati. Izoencimski markerji so še posebej uporabni za študij frekvenc alelov v različnih kolekcijah ter za identifikacijo staršev pri hibridnih vrstah (*Spooner in sod., 2005*).

Razvoj molekulskih markerjev je povzročil preobrat pri proučevanju genomov. Molekulski markerji za razliko od izoencimskih temeljijo na razlikah v zaporedju DNA, na katere okolje ne vpliva. To pomeni, da lahko pri povezovanju istih profilov pričakujemo, da gre za isti genotip (*Spooner in sod., 2005*). Danes je poznanih kar nekaj molekulskih markerjev, le-ti se razlikujejo v svojih lastnostih, ceni razvoja markerskega sistema, informativnosti in zahtevnosti tehnike. Glede na namen preučevanja organizma lahko izbiramo med hibridizacijskimi (RFLP¹ markerji – olimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov) in tehnikami z verižno reakcijo s polimerazo (PCR²). Med temi tehnikami najdemo naključno pomnoženo polimorfno DNA (RAPD³), polimorfizem dolžin namnoženih fragmentov (AFLP⁴) in mikrosatelite (*Bandelj in sod., 2002*).

¹ Angl. Restriction Fragment Length Polymorphism

² Angl. Polymerase chain reaction

³ Angl. Randomly Amplified Polymorphic DNA

⁴ Angl. Amplified Fragment Length Polymorphism

Preglednica : Klasifikacija molekulskih markerjev (*Spooner in sod., 2005*)

MOLEKULSKI MARKERJI	
Hibridizacijski markerji	PCR tehnike
1. polimorfizem dolžin restriksijskih fragmentov (RFLP – ang. Restriction Fragment Length Polymorphism)	1. mikrosateliti Imenujejo jih tudi enostavna ponovljiva zaporedja (SSR – ang. Simple Sequence Repeat) ali kratke tandemske ponovitve (STR- ang. Short Tandem Repeat)
	2. polimorfizem dolžin enostavnih zaporedij (SSLP- ang. Simple Sequence Length Polymorphism)
	3. namnoženi fragmenti določeni z nukleotidnim zaporedjem (SCAR – ang. Sequence Characterized Amplified Regions)
	4. CAPS – ang. Cleaved Aplified Polymorphic Site
	5. naključno namnožena polimorfna DNA (RAPD- ang. Random Amplified polymorphic DNA)

2.8 Predstavitev markerskega sistema RAPD

Popularnost tehnike RAPD je v začetku 90. narasla zaradi svoje enostavnosti. Tehniko sta istočasno in neodvisno razvili dve raziskovalni skupini (*Kojima in sod., 1998*). Williams in sod. (1990), ki so jo uporabili za gensko kartiranje, so jo poimenovali RAPD (naključno pomnožena polimorfna DNA), Welsh in McClelland (1990) pa sta jo poimenovala AP-PCR⁵ in jo uporabila za prstni odtis DNA⁶. Tehnika RAPD temelji na namnoževanju neznanih predelov DNA z uporabo začetnega oligonukleotida s poljubnim nukleotidnim zaporedjem v verižni reakciji s polimerazo (PCR). Rezultat namnoževanja so produkti DNA ali markerji RAPD. Le-ti se ločijo z elektroforezo na agaroznem gelu, zaznavamo pa jih s pomočjo etidijevega bromida pod UV svetlobo (*Williams in sod., 1990*).

Zaradi nizke razvojne cene in enostavnosti izvajanja tehnike so markerji RAPD dobili velike razsežnosti uporabe. Metoda ne vključuje hibridizacije, za reakcije so potrebne majhne koncentracije DNA in ne zahteva predhodnega poznavanja nukleotidnih zaporedij genoma, zato je uporabna tudi pri proučevanju manj znanih vrst (*Williams in sod., 1990*).

⁵ Angl. Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction

⁶ Angl. Fingerprinting DNA

Markerski sistem RAPD ima tudi omejitve. Med njimi najdemo problem dominantnosti markerjev (ne moremo ločiti heterozigotnih od homozigotnih dominantnih osebkov), občutljivost na pogoje reakcije ter problem zanesljivosti in primerljivosti rezultatov med laboratoriji (*Martins-Lopes in sod., 2007*).

2.9 Uporaba markerjev RAPD pri upravljanju kolekcijskih nasadov

Enostavno (vegetativno) razmnoževanje oljke je omogočilo intenzivno izmenjavo rastlinskega materiala v državah Sredozemlja. To je povzročilo zmedo pri imenovanju sort in klonov. Homonimi (ime, ki je bilo dodeljeno dvema različnima sortama) in sinonimi (sorta ima več različnih imen) pomenijo oviro pri vrednotenju genskih virov oljke. Prav zaradi tega je karakterizacija genotipov z molekulkimi markerji najbolj primeren način za pravilno identifikacijo sort, ki je ključnega pomena pri ločevanju sadilnega materiala v drevesnicah, pri vzgoji certificiranih sadik sort in klonov ter seveda pri upravljanju kolekcijskih nasadov (*Bandelj Mavsar, 2006*). Tako so markerji RAPD postali široko razširjeno orodje za proučevanje razlik v zbirkah posameznih držav, na primer v Italiji (*Fabri in sod., 1995*), Španiji (*Belaj in sod., 2001; Belaj in sod., 2004*) in Avstraliji (*Mekuria in sod., 1999*).

Predhodno poznavanje strukture genetske raznolikosti v okviru svetovne genske banke v Cordobi nam lahko pomaga pri strategijah gojenja določenih sort ter pri vodenju kolekcijskih nasadov (*Belaj in sod., 2002*).

V Španiji so *Belaj in sod. (2001)* preučevali sposobnost razločevanja in polimorfizem sort oljk, ki uspevajo v genski banki v Cordobi. Analiza je obsegala 51 reprezentativnih sort. V njej so avtorji ugotovili, da je markerski sistem RAPD zelo uporaben pri upravljanju genskih bank, saj omogoča hitro in natančno identifikacijo večjega števila sort.

Leta 2002 so se *Belaj in sod.* lotili nove raziskave, v kateri so preučevali večjo skupino sort (103) iz genske banke v Cordobi z uporabo markerjev RAPD. Glavni cilji raziskave so bili: opisati raznolikosti sort v svetovni genski banki oljk, proučiti vzorce raznolikosti sort različnega geografskega izvora, ovrednotiti sorodnost med sortami znotraj kolekcije, uporabiti dobljene informacije v žlahtniteljskih programih ter podati strategijo vzorčenja v kolekcijah

genskih virov oljke. Z združevanjem sorodstvenih skupin sort sosednjih območij so dokazali, da imajo le-te skupno osnovo. Veliko genetsko variabilnost kažejo sorte z osrednjega in vzhodnega Sredozemlja in francoske sorte, kar pomeni, da imajo skupen izvor.

Prav tako so raziskave potekale v Španiji, natančneje v provinci Malaga (Andaluzija) v južni Španiji, za katero so značilna območja, ki se razlikujejo v pedoklimatskih razmerah. *Claros in sod.* (2000) so predpostavljali, da je v tem območju zelo velika variabilnost oljk, ki je nastala kot posledica na okoljske razmere. Analizirali so 56 dreves 22 sort iz različnih oljčnikov. Analiza profilov RAPD je pokazala prisotnost sinonimov, v enem primeru pa so odkrili homonim. Z markerji RAPD so ugotavljali genetsko sorodnost. Odkrili so 3 skupine, med katerimi je ena vključevala avtohtone andaluzijske sorte, kar nakazuje, da so le-te nastale v območju s selekcijo.

Tako kot v drugih evropskih državah, je tudi v Franciji potekal revitalizacijski program oljkarstva. Le-ta je vključeval osnovanje podatkovne baze referenčnih genotipov oljk in je v pomoč drevesničarjem pri certifikaciji in identifikaciji sadilnega materiala. *Khadari in sod.* (2003) so z markerji RAPD (4 začetni oligonukleotidi) opisali 497 dreves (95 sort, 123 akcesij, ostalo različni križanci in kloni). S kombinacijo 32 namnoženih markerjev RAPD so dobili 114 profilov, in tako odkrili prisotnost sinonimov in hononimov ter številne nepravilnosti pri opisih sadilnih mest. Da bi dobili pravi referenčni profil sorte za podatkovno bazo, avtorji predlagajo pregled večjega števila dreves iste sorte.

Zaradi zmede pri poimenovanju in klasifikaciji številnih sort, ki uspevajo v Siriji, so *Belaj in sod.* (2003) v raziskavi z markerji RAPD analizirali 32 akcesij, zbranih v genski banki v Cordobi. Uporabili so 13 začetnih oligonukleotidov in odkrili 84,9-odstotni polimorfizem. V dveh primerih so ugotovili napačen opis sadilnega mesta v kolekciji, med drevesi znotraj sort pa molekulskih razlik niso odkrili.

Cavagnaro in sod. (2001) so v Argentini proučevali sorte španskega in italijanskega izvora, saj so pričakovali, da obstaja možnost napačnih imenovanj sort. Preučili so 10 najpogostejših sort, ki se nahajajo v kolekciji v Mendози. V analizo RAPD so vključili tudi nekatere istoimenske sorte iz genske banke v Cordobi. Pri primerjavi profilov RAPD sedmih sort iz kolekcije v Argentini in iz svetovne kolekcije so ugotovili, da ima le sorta »Manzanilla de Carmona« identičen profil RAPD. Pri ostalih sortah ("Empeltre", "Farga", "Española"...) pa

so se profili razlikovali. Razlike v profilih RAPD istoimenskih sort so verjetno posledica obstoja različnih koklonov znotraj sort ali napačnega poimenovanja.

Oljke v Albaniji veljajo za pomembno točko biološke diverzitete. Nahajajo se na zahodnih obalah Sredozemlja in so del evropsko-azijske flore. Po podatkih *Dodona in sod. (2010)* se v Albaniji že več let ukvarjajo z identifikacijo in opisom lokalne biodiverzitete. To počnejo tudi na področju oljkarstva, saj želijo preprečiti gensko erozijo. Med sortami so identificirali 46 različnih genotipov, 11 med njimi je bilo sinonimov. Z analizo RAPD so proučili vseh 22 albanskih oljčnih kultivarjev, ki so potrdili hipotezo o domačem izvoru njihovih dreves ter njihovo minimalno širjenje iz izvornih regij.

Raziskave z markerji RAPD potekajo tudi v Avstraliji. *La Mantia in sod. (2006)* so raziskovali vzorce sort iz kolekcije »NOVA« (*National Olive Variety Assessment*), ki se nahaja v Adelaideu v južni Avstraliji ter 10 vzorcev iz Združenih držav Amerike. Z markerji RAPD so uspešno raziskali vseh 100 vzorcev iz kolekcije. Odkrili so 58 različnih genotipov, razporejenih v 15 skupin. Osem skupin je imelo genetsko podobnost s sortami iz kolekcije, ostalih sedem skupin pa niso mogli identificirati.

Na Portugalskem so *Cordeiro in sod. (2008)* raziskali 85 oljčnih sort z uporabo markerjev RAPD. Skupno so z začetnimi oligonukleotidi OPR-1, OPK-14 in OPA-1 opisali 29 različnih genotipov. Analiza je pokazala precejšnje razlike med posameznimi sortami, kar je otežilo izdelavo filogenetskih skupin. Med raziskanimi sortami so se med seboj najbolj razlikovale sorte "Galega", "Redondal" in "Tentilheira".

V Tuniziji so *Zitoun in sod. (2008)* z uporabo markerskega sistema RAPD raziskali 84 vzorcev iz kolekcije v Boughrara-Sfax. Njihove genotipe so primerjali z vzorci iz zahodnega in vzhodnega Sredozemlja. Rezultati so pokazali, da so vzorci iz Tunizije najbolj podobni vzorcem iz zahodnega Sredozemlja, nekateri pa so imeli podobne lastnosti kot vzorci z vzhoda Sredozemlja. To kaže na kompleksen izvor tunizijskih oljk.

3. MATERIALI IN METODE DE LA

3.1 Rastlinski material

Liste za izolacijo oljčne DNA smo nabrali v nacionalnem kolekcijskem nasadu v Strunjanu oktobra 2010. Sadike oljk so bile vzgojene v Centru za razmnoževanje oljke na Purissimi v Ankaranu. Drevesa v nasadu so bila posajena spomladi 1995. Nekaj dreves je pozeba leta 1996 uničila, zato so bila kasneje dosajena. Tako se danes v nasadu nahaja 94 dreves, ki predstavljajo 21 različnih sort.



Slika : Nacionalni kolekcijski nasad Strunjan (Foto: Špela Božič)

Analizirani vzorci sort so predstavljeni v Preglednici 2.

Preglednica : Ime sort in število analiziranih dreves v nacionalnem kolepcijskem nasadu Strunjan

Sorta/genotip	Uradna kratica	Število dreves v kolekciji
Arbequina	A	4
Ascolana tenera	At	6
Athena	Ah	5
Belica Pucer	Bp	5
Buga	Bu	5
Cipressino	C	5
Coratina	Co	5
Črnica	Č	3
Frantonio	F	5
Grignan	G	5
Itrana	I	2
Maurino	M	5
Moraiolo	Mo	3
Nocelara del Belice	Nb	5
Picholine	Pi	5
Rozi (mata, Sandi)	R	3
Samo	S	4
Samo Nova Vas	Sn	3
Santa Caterina	Sc	6
Štorta	Š	5
Zelenjak viseča	Zv	5
Skupaj dreves:		94
Skupaj sort:		21

3.2 Izolacija celokupne DNA

DNA oljke smo izolirali iz oljčnih listov po uveljavljenem protokolu (Kump in sod., 1996). V terilnico smo dali približno 1 cm² 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 -merkaptotanol], ki smo ga predhodno segreti na 68 °C, homogenizirali. Homogenizirane vzorce smo prenesli v 1,5-mililitrske mikrocentrifugirke in jih 1,5 ure inkubirali v vodni kopeli pri 68 °C. Vzorce smo občasno rahlo premešali. Po inkubaciji smo dodali 500 μ l mešanice fenola, kloroforma in izoamilalkohola, pripravljene v razmerju 25 : 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-milimetrsko mikrocentrifugirko in DNA oborili z dodatkom 50 µl 3 M Na-acetata (1/10 volumna, pH 5,2 uravnan z očetno kislino) in 500 ml ledeno hladnega izopropanola (1 volumen). Vzorce smo premešali in inkubirali 30 min pri –20 °C. Sledilo je 15-minutno centrifugiranje pri 11000 g in temperaturi 4 °C. Supernatant smo odpipetirali, usedlino DNA sprali s 500 µl 70-odstotnega 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 DynaQuant (Amersham Biosciences) po navodilih proizvajalca.

3.4 Namnoževanje fragmentov RAPD

Za namnoževanje naključnih predelov DNA vzorčnih oljk smo uporabili 5 začetnih oligonukleotidov (OPX-03, OPX-08, OPX-11, OPA-01, OPA-08). Nukleotidna zaporedja uporabljenih začetnih oligonukleotidov (Operon Technologies, Alameda, CA, ZDA) so predstavljena v Preglednici 2. 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 MgCl₂; 50 mM KCl], 3,5 mM MgCl₂, 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).

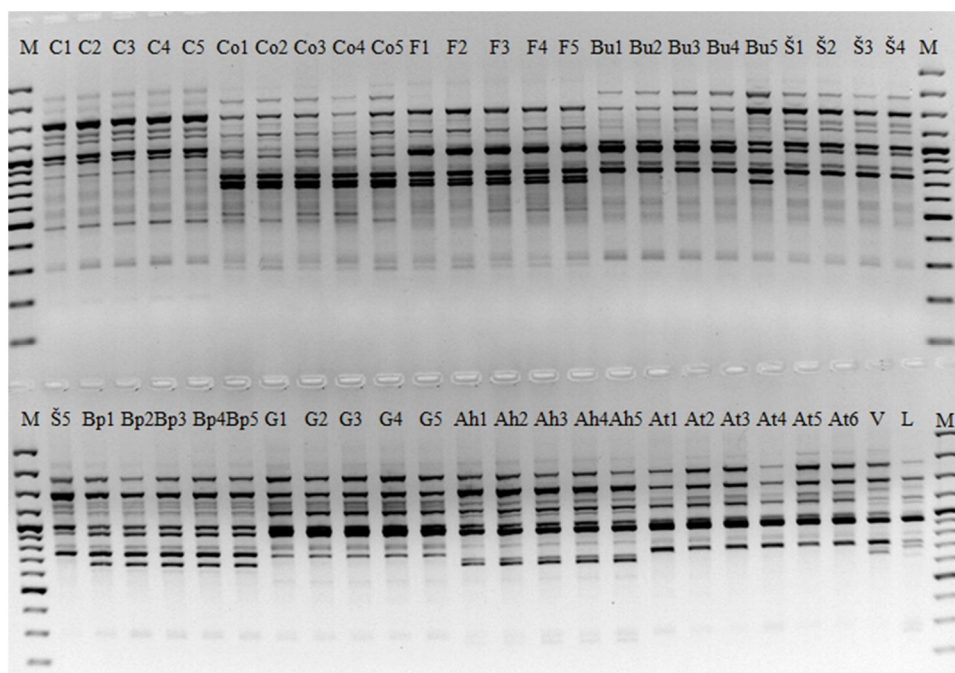
Preglednica 3: Nukleotidna zaporedja uporabljenih začetnih oligonukleotidov

Začetni oligonukleotid	Zaporedje 5'- 3'
OPX-03	TGGCGCAGTG
OPX-08	CAGGGGTGGA
OPX-11	GGAGCCTCAG
OPA-01	CAGGCCCTTC
OPA-08	GTGACGTAGG

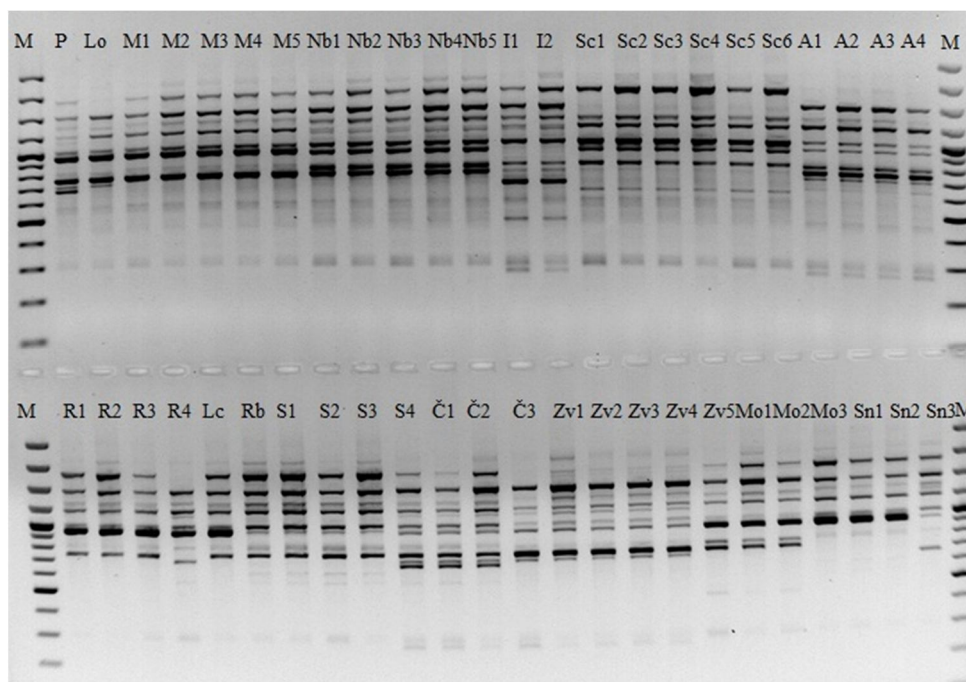
Namnoževanje naključnih predelov DNA je potekalo po protokolu Šuštar-Vozlič in Javornik (1999) v cikličnem termostatu DNA-ENGINE Thermal Cycler 200 (Bio-Rad Laboratories, California, ZDA) po naslednjem temperaturnem profilu:

- 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.

Vzorci smo do nadaljnjih analiz hranili na 4 °C.



Slika : Na agaroznem gelu ločeni produkti reakcije PCR z začetnim oligonukleotidom OPX-08 pri 48 vzorcih oljk (1. del)



Slika : Na agaroznem gelu ločeni produkti reakcije PCR z začetnim oligonukleotidom OPX-08 pri 48 vzorcih oljk (2. del)

5. REZULTATI Z DISKUSIJO

5.1 Primerjava profilov RAPD med drevesi znotraj sort

Namen raziskave je preveriti identifikacijo dreves posameznih sort na sadilnih mestih v nacionalnem kolekcijskem nasadu v Strunjanu. Opravili smo primerjavo profilov DNA dreves. V analizo smo vključili 21 različni sort oljk in za pomnoževanje DNA uporabili 5 začetnih oligonukleotidov serije OPX in OPA. Izbrani začetni oligonukleotidi so bili izbrani glede na sposobnost odkrivanja polimorfizmov pri oljki.

Preglednica 4: Seznam začetnih oligonukleotidov, največje in najmanjše število namnoženih markerjev ter povprečje namnoženih markerjev

Začetni oligonukleotid	Največje število pomnoženih markerjev	Najmanjše število pomnoženih markerjev	Povprečje pomnoženih markerjev
OPX-03	12	6	9 (8,77)
OPX-08	9	5	7 (7,09)
OPX-11	11	5	7 (7,45)
OPA-01	8	4	7 (6,63)
OPA-08	9	3	5 (4,86)

Pri analizi smo upoštevali le dobro pomnožene in razločne markerje. Iz Preglednice 4 je razvidno, da je bilo največ (12) markerjev RAPD namnoženih z začetnim oligonukleotidom OPX-03, najmanj (5) pa z začetnim oligonukleotidom OPA-08. Vsi uporabljeni oligonukleotidi so omogočili namnožitev zadostnega števila markerjev za primerjavo profilov posameznih vzorcev (dreves) in primerjavo med sortami.

Pri primerjavi identičnosti profilov DNA posameznih dreves znotraj sort dreves smo pri 20 analiziranih sortah odkrili enakost profilov z vsemi petimi začetnimi oligonukleotidi. To potrjuje izenačenost genetskega materiala znotraj sort. Pri sorti Buga so bili pri štirih drevesih profili DNA identični, pri petem drevesu (Bu5) pa smo odkrili različen vzorec razporeditve markerjev. Z nadaljnjo analizo se je izkazalo, da ima vzorec Bu5 identičen profil s sorto "Belica Pucer" ("Istrska belica") z vsemi petimi začetnimi oligonukleotidi. Prav tako je molekulska analiza pokazala, da sta sorti "Samo" in "Samo Nova vas" različni. Njuna števila

namnoženih markerjev se namreč pri različnih začetnih oligonukleotidih razlikujejo (Preglednica 5).

Tudi drugod po svetu raziskovalci opravljajo podobne raziskave. Tako so pri primerjavi profilov RAPD sedmih sort iz kolekcije v Argentini *Cavagnaro in sod. (2001)* odkrili, da ima samo ena sorta identičen profil RAPD, profili ostalih sort pa so se razlikovali. Kot posledico razlik v profilih RAPD istoimenskih sort so navedli obstoj različnih klonov znotraj sort ali napačno poimenovanje. Podobne raziskave so opravili tudi v Avstraliji. Razlike v molekulski analizi smo odkrili tudi v naši raziskavi. Ugotovili smo, da sta sorti "Samo" in "Samo Nova vas" različni. Njuna števila namnoženih markerjev se namreč pri različnih začetnih oligonukleotidih razlikujejo. Za analizo 85 sort so *Cordiero in sod. (2008)* iz Portugalske prav tako uporabili začetne oligonukleotide serije OPA kot mi ter z njimi opisali 29 različnih genotipov. Med raziskanimi sortami so odkrili tri, ki so se med seboj najbolj razlikovale.

Preglednica 5: Primerjava števila namnoženih markerjev z različnimi začetnimi oligonukleotidi pri sortah v nacionalnem kolekcijskem nasadu Strunjan

Št.	Sorta	Oznaka	OPX-03 Število namnož. markerjev	OPX-08 Število namnož. markerjev	OPX-11 Število namnož. markerjev	OPA-01 Število namnož. markerjev	OPA-08 Število namno. markerjev
1	Arbequina	A1-A4	7	7	7	7	3
2	Ascolana tenera	At1-At6	11	7	9	6	6
3	Athena	Ah1-Ah5	10	9	7	4	5
4	Belica Pucer	Bp1-Bp5	8	7	7	7	3
5	Buga	Bu1-Bu4	9	6	6	6	7
6	Buga	Bu5	8	7	7	7	3
7	Cipressino	C1-C5	9	7	6	6	3
8	Coratina	Co1-Co5	9	7	5	7	8
9	Črnica	Č1-Č3	8	8	9	8	9
10	Frantonio	F1-F5	12	6	6	8	5
11	Grignan	G1-G5	10	7	7	6	6
12	Itrana	I1-I2	11	8	7	7	4
13	Maurino	M1-M5	9	7	7	7	4
14	Moraiolo	Mo1-Mo3	9	7	10	8	4
15	Nocelara del Belice	Nb1-Nb5	8	8	8	8	3
16	Picholine	Pi1-Pi5	6	7	8	6	3
17	Rozi (mata, Sandi)	R1,R3,R4	8	6	10	7	5
18	Samo	S1-S4	10	7	11	7	6
19	Samo Nova Vas	Sn1-Sn3	10	5	8	7	3
20	Santa Caterina	Sc1-Sc6	7	7	7	5	6
21	Štorta	Š1-Š5	8	8	4	5	4
22	Zelenjak viseča	Zv1-Zv5	6	8	8	7	7

6. ZAKLJUČEK

Oljčno olje je danes poznano že po celem svetu. Gojenje oljk za namen pridobivanja olja se je tako iz Sredozemlja, prvotnega območja gojenja, razširilo na večino kontinentov. Tako lahko oljčne nasade najdemo še v Avstraliji, ZDA in Afriki. Danes gojimo več kot 1200 različnih sort oljk. Ta izjemna pestrost je posledica dobre regeneracijske sposobnosti oljke ter uspešnega vegetativnega razmnoževanja. Danes, ko v svetu potekajo programi izboljšanja rastlinskega materiala oljke, se pojavljajo problemi v obliki pomanjkljivih podatkov o opisu določene sorte. V preteklosti je identifikacija sort temeljila na opisu lastnosti posamezne rastline, danes pa so v uporabi različni molekulkimi markerji, ki so povzročili preobrat pri proučevanju genomov oljk. Za optimizacijo pridelave, ki je dandanes trend v vseh državah, je potrebna sistematična preučitev obstoječih genskih virov oljke. V ta namen v različnih državah ustanovljajo nacionalne ali mednarodne kolekcijske nasade ali pa obstoječe genske vire vključujejo v zbirke velikih genskih bank, ki so razširjene po celem svetu. Predstavitev markerskih sistemov, opis kolekcijskih nasadov ter genskih bank sem predstavila v svoji zaključni nalogi.

RAPD markerje lahko uporabimo za:

- identifikacijo sort,
- preverjanje pravilnosti opisov sadilnih mest v nacionalnem kolekcijskem nasadu Strunjan,
- raziskavo genetske variabilnosti znotraj sort.

V analizo je bilo vključenih 21 sort iz nacionalnega kolekcijskega nasada Strunjan. Za pomnoževanje DNA smo uporabili 5 začetnih oligonukleotidov serije OPX in OPA, pri analizi pa smo upoštevali le dobro pomnožene in razločne markerje. Največ markerjev RAPD je bilo namnoženih z začetnim oligonukleotidom OPX-03, najmanj pa z začetnim oligonukleotidom OPA-08. Tako smo pri 20 analiziranih sortah odkrili enakost profilov z vsemi petimi začetnimi oligonukleotidi. Pri sorti "Buga" pa smo pri petem drevesu (Bu5) odkrili različen vzorec razporeditve markerjev. Z nadaljnjo analizo se je izkazalo, da ima

vzorec Bu5 identičen profil s sorto "Belica Pucer" ("Istrska belica") z vsemi petimi začetnimi oligonukleotidi.

Na koncu lahko dodam, da so markerji RAPD po mojem mnenju uporabni pri upravljanju kolekcijskih nasadov, kot je nasad v Strunjanu. Z identifikacijo genotipa se preverja tudi pravilnost opisa posameznega sadilnega mesta. RAPD markerje za upravljanje kolekcij uporabljajo tudi drugod po svetu, na primer v Italiji, Španiji in Avstraliji.

7. VIRI:

- Baldoni L., Belaj A. 2009. Oil crops: Handbook of plant breeding 4. 397–421
- Bartolini G., Prevost G., Messeri C., Carignani G., Menini U. 1998. *Olive germplasm: Cultivars and World-wide Collections*. FAO, Rome
- Bandelj D., Jakše J., Javornik B. 2001. Identification of olive (*Olea europaea* L) cultivars by molecular markers.
- Bandelj D., Jakše J., Javornik B. 2002. Genetske raziskave oljke. *Annales, Series Historia Naturalis*, 12 (2): 239–248
- Bandelj Mavsar D. 2006. Mikrosatelitski markerji in njihova uporabnost v oljkarstvu. *Annales, Series Historia Naturalis*, 16 (2): 209–222
- Belaj A., Trujillo I., de la Rosa R., Rallo L., Giménez M.J. 2001. Polymorphism and discrimination capacity of randomly amplified polymorphic markers in an olive germplasm bank. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, (126): 64–71
- Belaj A., Satovic Z., Rallo L., Trujillo I. 2002. Genetic diversity and relationships in olive (*Olea europaea* L) germplasm collectios as determined by Randomly Amplified Polymorphic DNA. *Theor. Appl. Genet.*, (105): 638–644
- Belaj A., Caballero J.M., Barranco D., Rallo L., Rujillo I. 2003. Genetic characterization and identification of new accessions from Syria in an olive germplasm bank by means of RAPD markers. *Euphytica*, (134): 33–41
- Belaj A., Rallo L., Trujillo I., Baldoni L. 2004. Using RAPD and AFLP markers to distinguish individuals obtained by clonal selection of »Arbequina« and »Manzanilla de Sevilla« olive. *Hort. Sci.*, (39): 1556–1570
- Besnard G., Baradat P., Bervillé A. 2001. Genetic relationships in the olive (*Olea europaea* L) reflect multilocal selection of cultivares. *Theor. Appl. Genet.*
- Bretton C., Tersac M., Bervillé A. 2006. Genetic diversity and gene flow between the wild olive (oleaster, *Olea europaea* L) and the olive: several Plio-Pleistocene refuge zones in the Mediterranean Basin suggested by simple sequence repeats analysis. *J. Biogeog.*, (33): 1916–1928

- Bučar-Miklavčič M., Butinar B., Jančar M., Sotlar M., Vesel V. 1997. Oljka in oljčno olje. Ljubljana, Kmečki glas: 142 str.
- Carrion J.S., Dupre M. 1996. Late quaternary vegetational history at Navarrés, Eastern Spain. A two core approach. *New Phytol*, (134): 177–191
- Cavagnaro P., Juarez J., Bauzá M., Masuelli R.W. 2001. Discriminación de variedades de olivo a través del uso de caracteres morfológicos y de marcadores moleculares. *Agri. Sci.*, (18): 27–35
- Claros M.G., Crespillo R., Aguilar M.R., Cánovas F.M. 2000. DNA fingerprinting and classification of geographically related genotypes of olive tree olive (*Olea europaea* L). *Euphytica*, (116): 131–142
- Cordiero A.I., Sanchez-Sevilla J.F., Alvarez-Tinaut M.C., Gomez-Jimenez M.C. 2008. Genetic diversity assessment in Portugal accessions of olive *Olea europaea* by RAPD markers. *Biol. Planta.*, (52): 642–647
- de Vicente M.C., Andersson M.S. 2006. DNA banks-providing novel options for genebanks? *Topical Reviews in Agricultural Biodiversity*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy
- Dodona E., Ismaili H., Cimato A., Imeri A., Vorpsi V. 2010. Administration of biodiversity of the autochtones olive trees in Albania. *Res. J.Agric. Sci.*, (42): 239–247
- Doveri S., Baldoni L. 2007. *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants, Volume 4: Fruit and Nuts*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 254–264
- Engels J.M.M., Visser L. 2003. A guide to effective management of germplasm collections. *IPGRI Handbooks for Genebanks No. 6*
- Fabri A., Hormaza JI., Polito VS. 1995. Random amplified polymorphic DNA analysis of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, (120): 538–542
- Green P.S., Wickens G.E. 1989. The *Olea europaea* complex. V: The Davis & Hedge - Festschrift. Kit Tan (ed). Edinburgh, Edinburgh University Press, 287–299
- Khadari B., Breton C., Mountier N., Roger J.P., Besnard G., Bervillé A., Dosba F. 2003. The use of molecular markers for germplasm management in a French olive collection. *Theor. Appl. Genet.*, (106): 521–529

- Kojima T., Nagaoka T., Noda K., Ogihara Y. 1998. Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.*, (96): 37–45
- Kump B., Javornik B. 1996. Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) populations by RAPD markers. *Plant Sci.*, (114): 149–158.
- Lumaret R., Ouzanni N., Michaud H., Vivier G., Deguilloux M.F. Di Giusto F. 2004. Allozyme variation of the oleaster populations (wild olive tree) (*Olea europaea* L) in the Mediterranean Basin. *Heredity*, (92): 343–351
- La Mantia M., Guerin J., Sedgley M., Barone E. 2006. Identification of olive (*Olea europaea* L.) genotypes using SSR and RAPD markers. *Actes Éditions, Rabat*: 9–14
- Martins-Lopes P., Lima-Brito J., Gomes S., Meirinhos J., Santos L., Guedes-Pinto H. 2007. RAPD and ISSR markers in *Olea europaea* L.: Genetic variability and molecular cultivar identification. *Genetic Resources and Crop Evolution*, (54):117–128
- Mekuria GT., Collins GG., Sedgley M. 1999. Genetic variability between different accessions of some common commercial olive cultivars. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* (74): 309–314
- Rodríguez-Ariza M.O., Montes-Moya E. 2005. On the origin and domestication of *Olea europaea* L (olive) in Andalucía, Spain based on the biogeographical distribution of its finds. *Veget, Hist. Archaeobot.*, (14): 551–561
- Ryder O.A., McLaren A., Brenner S., Zhang Y-P., Benirschke K. 2000. DNA banks for endangered animal species. *Science*, 288 (5464): 275–277
- Terral J.F. 2000. Exploitation and management of the olive tree during prehistoric times in Mediterranean France and Spain. *J. Arc. Sci.*, (27): 127–133
- Terral J.F., Alonso N., Capdevila R.B., Chatti N., Fabre L., Fiorentino G., Marinval P., Jordá G.P., Pradat B., Rovira N., Alibert P. 2004. Historical biogeography of olive domestication (*Olea europaea* L) as revealed by geometrical morphometry applied to biological and archeological material. *J. Biogeog.*, (31): 63–77

- Spooner D., van Treuren R., de Vicente M.C. 2005. Molecular markers for genebank management. IPGRI Technical bulletin No.10. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Šuštar-Vozlič J. in Javornik B. 1999. Genetic relationships in cultivars of hop, *Humulus lupulus* L., determined by RAPD analysis. Plant breed., (118): 175–181
- Vesel V., Valenčič V., Jančar M., Čalija D., Butinar B., Bučar-Miklavčič M. 2009. Oljka – živilo, zdravilo, lepotilo. Ljubljana. Kmečki glas: 141 str.
- Wallander E., Albert V.A., 2000. Phylogeny and classification of Oleaceae based on rps16 and trnL-F sequence data. Am. J. Botan., 87 (12): 1827–1841
- Watts W.A., Allen J.R.M., Huntley b. 1996. Vegetation history and paleoclimate of the last glacial period at Lago Grande di Monticchio, Southern Italy. Quart. Sci. Rev., (15): 133–153
- Welsh J., McClelland M.1990. Fingerprinting genomes using PCR arbitrary primer. 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
- Zitoun B., Bronzini de Craffa V., Giannettini J., Breton C., Trigui A., Maury J., Gambotti C., Marzouk B., Berti L. 2008. Genetic diversity in Tunisian olive accessions and their relatedness with other Mediterranean olive genotypes. Scen. Horti., (115): 416–419

