

MIKROSATELITSKI MARKERJI IN NJIHOVA UPORABNOST V OLJKARSTVU

*Dunja BANDELJ MAVSAR*Univerza na Primorskem, Znanstveno-raziskovalno središče Koper, SI-6000 Koper, Garibaldijeva 1
E-mail: dunja.bandelj@zrs-kp.si

IZVLEČEK

Mikrosateliti se uporabljajo v genetskih raziskavah rastlin za študije raznolikosti, starševske analize, izdelavo genetskih kart in za genotipizacijo. Vsestranska uporabnost in popularnost mikrosatelitov temelji na pozitivnih lastnostih markerskega sistema: visoka pogostost pojavljanja v evkariotskih genomih, kodominatnost, hipervariabilnost, robustnost in visoka informacijska vrednost. Prvi mikrosateliti oljke so bili objavljeni v letu 2000 in od tedaj se pogosto vključujejo v različne genetske raziskave oljk. V delu so predstavljene karakteristike objavljenih mikrosatelitov oljke in njihova uporabnost v genetskih študijah.

Ključne besede: mikrosateliti, SSR, *Olea europaea* L., oljkarstvo, polimorfizem

MARCATORI MICROSATELLITARI E IL LORO IMPIEGO NELL'OLIVICOLTURA

SINTESI

I microsatteliti vengono utilizzati nelle ricerche genetiche delle piante, inerenti la diversità, l'analisi parentale, l'elaborazione di mappe genetiche e la genotipizzazione. L'impiego universale e la popolarità dei microsatteliti sono dovuti alle caratteristiche positive del sistema di marcatori: alta frequenza di presenza nei genomi eucariotici, codominanza, ipervariabilità, robustezza ed alto valore informativo. I primi microsatteliti dell'olivo sono stati pubblicati nel 2000 e da allora vengono di frequente inseriti in diverse ricerche genetiche degli olivi. Nell'articolo vengono presentate le caratteristiche dei microsatteliti dell'olivo pubblicati e il loro impiego negli studi genetici.

Parole chiave: microsatteliti, SSR, *Olea europaea* L., olivicoltura, polimorfismo

UVOD

Oljko že tisočletja gojijo na območju sredozemskega bazena, v glavnem zaradi pridobivanja oljčnega olja, ki ima izredno pomembno vlogo v človekovi prehrani. Zaradi ugodne sestave maščobnih kislin in vsebnosti številnih biološko pomembnih spojin uvrščamo oljčno olje med funkcionalna živila, za katerim povpraševanje na trgu nenehno narašča. Raziskave so pokazale, da so lastnosti oljčnega olja odvisne od sortne strukture oljk, h kakovosti in tipičnosti olja pa prispevajo tudi pedoklimatski dejavniki pridelovalnega območja in tehnologija predelave oljk. Sortna struktura je nastajala več stoletij in v literaturi je omenjenih več kot 1000 oljčnih sort, ki so se izoblikovale s selekcijskim pritiskom na agronomsko pomembne lastnosti ali spontano s križanjem gojenih in divjih oljk (Rugini & Baldoni, 2005). Izredna genska raznolikost oljk in pomanjkanje žlahtnjiteljskih programov, ki bi privedli do izboljšanja genskih virov, so glavni razlog pospešenega preučevanja genetske strukture oljk. Do razvoja molekularnih markerjev so raziskave genskih virov temeljile na uporabi klasičnih metod z opisovanjem morfoloških markerjev. Fenotipsko vrednotenje rastlinskega materiala je metodološko zapleteno, odvisnost morfoloških markerjev od dejavnikov okolja pa močno omejuje njihovo uporabo v genetskih študijah.

V zadnjih dvajsetih letih je razvoj številnih markerjev DNA omogočil revolucionarni pristop pri preučevanju strukture genoma in genske raznolikosti pomembnejših kmetijskih rastlin. Napredku molekularne biologije je sledilo tudi oljkarstvo, in markerji DNA se danes rutinsko uporabljajo za molekularno karakterizacijo in identifikacijo oljčnih sort, v študijah izvora in domestikacije oljke, pri preučevanju genske variabilnosti divjih in kultiviranih oljk, identifikaciji markerjev, vezanih na agronomsko pomembne lastnosti, in pri genskem kartiranju (Bandelj *et al.*, 2002a). Večina razvitih markerskih sistemov je uporabnih tudi za genotipiziranje DNA oljk (RFLP, RAPD in AFLP). Kljub popularnosti teh tehnik pa je zanimanje med raziskovalci za novejšje markerje, kot so mikrosateliti, vse večje. Z objavo tehnike mikrosatelitov (Litt & Luly, 1989) so ti markerji postali najbolj priljubljeni za molekularno karakterizacijo različnih rastlinskih vrst (Gupta & Varshney, 2000). Le-ti združujejo lastnosti različnih markerjev in jih v literaturi pogosto predstavljajo kot idealen markerski sistem. Prvi mikrosateliti oljke so bili identificirani in predstavljeni šele v letu 2000 (Rallo *et al.*, 2000; Sefc *et al.*, 2000) in od tedaj se uspešno vključujejo v genetske raziskave oljk z različnimi cilji.

Namen pričujočega dela je podrobneje predstaviti mikrosatelitski markerski sistem, opisati karakteristike identificiranih mikrosatelitov oljke ter predstaviti njihovo uporabnost v genetskih raziskavah oljk.

MIKROSATELITI V RASTLINAH

Skupna lastnost evkariotskih genomov je ta, da vsebujejo tandemske ponavljajoče se DNA, ki so jo poimenovali satelitna DNA. Odkrili so jo pri ultracentrifugiranju DNA v gradientnem mediju, ko se je le ta porazdelila v več plasti, med katerimi je plast vsebovala DNA, sestavljeno iz skupine tandemske ponavljajočih se zaporedij. Satelitno DNA glede na dolžino osnovnega motiva delimo v tri skupine (Armour *et al.*, 1999):

1. sateliti: sestavljeni so iz osnovnega nukleotidnega zaporedja (motiva) dolžine do 200 baznih parov (bp), več takih ponovitev skupaj tvori satelit, ki ima lahko skupno dolžino nekaj magabaznih parov in predstavlja nekaj odstotkov genoma,
2. minisateliti: osnovni motiv je sestavljen iz več kot 10 nukleotidov, ki lahko dosežejo skupno dolžino od 0,5 do 30 kbp,
3. mikrosateliti: osnovni motiv je kratek (od 1 do 6 bp) in na posameznem lokusu tvori ponovitve skupne dolžine od 20 do 100 bp.

V literaturi se pojavljajo različna poimenovanja mikrosatelitov: STR (angl. Short Tandem Repeats – kratke tandemske ponovitve), SSR (angl. Simple Sequence Repeats – enostavna ponovljiva zaporedja), SSLP (angl. Simple Sequence Length Polymorphism – polimorfizem dolžin enostavnih zaporedij) in VNTR (angl. Variable Number of Tandem Repeats – spremenljivo število tandemske ponovitve).

Glede na tip ponovitve osnovnega motiva, Chambers & MacAvoy (2000) predlagata naslednje poimenovanje mikrosatelitov:

- popoln mikrosatelit (angl. pure microsatellite) je sestavljen iz enega samega motiva baz, ki se tandemske ponavlja in ni prekinjen z nobeno drugo bazo, npr. (AC)₁₄;
- sestavljen mikrosatelit (angl. compound microsatellite) sestavljata vsaj dva različna osnovna motiva ponovitve, npr. –(CT)₂₂(CA)₆;
- popoln in prekinjen mikrosatelit (angl. interrupted pure microsatellite) ima osnoven motiv prekinjen z insercijo enega nukleotida ali več baznih parov, ki se razlikujejo od osnovnega motiva, npr. (CA)₄TA(CA)₇;
- sestavljen in prekinjen mikrosatelit (angl. interrupted compound microsatellite) ima poleg vsaj dveh različnih osnovnih motivov še krajšo insercijo baznih parov, ki se razlikujejo od osnovnih motivov, npr. (AC)₁₄AGAA(AG)₁₂;
- kompleksen mikrosatelit (angl. complex microsatellite) je širši izraz za popolne in sestavljene mikrosatelite, ki nastanejo zaradi insercij baz, ki predstavljajo kratko ponovitev, npr. (TC)₄(T)₆(CT)₄CTCC(TCC)₆.

Poznana so tudi zaporedja DNA, ki ne vsebujejo ponovljivih motivov, ampak so nekakšno vmesno stanje, sestavljena iz več mešanih motivov, ki rahlo nakazujejo

na tandemsko ureditev. Ta zaporedja so poimenovali z izrazom prikrita enostavnost (angl. *cryptic simplicity*), za katere Hancock (1999) meni, da predstavljajo propadajočo mikrosatelitsko regijo, izpostavljeno številnim točkovnim mutacijam. Kriptične regije so lahko tudi mesto nastanka novih mikrosatelitov (Tautz *et al.*, 1986). Proces izginjanja in nastajanja novega mikrosatelita potekata istočasno. Kratki mikrosateliti (imenovani tudi proto-mikrosateliti) nastajajo naključno, najprej pride do točkovnih mutacij, ki jim sledijo še redki zdrsji vijačnice med replikacijo (Levinson & Gutman, 1987).

Nestabilnost mikrosatelitskih lokusov in posledično velika variabilnost mikrosatelitskih markerjev sta prispevala k popularnosti markerskega sistema in njegove uporabe v mnogih evolucijskih in genetskih študijah. Velik polimorfizem je posledica sprememb v številu ponovitev osnovnega motiva, za kar sta odgovorna predvsem dva mehanizma, ki se verjetno dopolnjujeta (Eisen, 1999):

1. Model nepravilnega parjenja zdrsnenih verig med replikacijo DNA (model SSM – Slip-Strand Mismatching) predvideva mutacijo, ki jo povzroči zdrs DNA v kompleksu s polimerazo, kar lahko povzroči nekomplementarnost matrične in nove sintetizirane verige. Če popravljalni mehanizmi napake zaradi zdrsa ne odpravijo, ostane poravnava obeh verig nepravilna. Mikrosatelitske ponovitve se zlahka izvijajo iz vijačnice 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. Neenak *crossing-over* (model UCO – Unequal Crossing-Over) nastane kot rezultat rekombinacije med homolognima kromosomoma, ki nista bila popolno poravnana. Verjetnost nepravilne poravnave je zaradi mikrosatelitskih ponovitev velika.

Mutacijska stopnja vseh mikrosatelitskih lokusov ni enaka. Dognano je bilo, da na njen nivo vplivajo: število ponovitev in nukleotidno zaporedje osnovnega motiva, dolžina ponavljajoče se enote, DNA-zaporedje obrobnih regij, prekinitve v mikrosatelitu, stopnja rekombinacije in transkripcije. Raziskave mutacijske stopnje in evolucijske dinamike mikrosatelitov s številnimi odkritimi protislovji je nazorno povzel Schlötterer (2000).

Številne raziskave so pokazale, da se nukleotidna zaporedja minisatelitov in mikrosatelitov ne pojavljajo samo v nekodirajočih regijah genoma, kot je bilo prvotno mišljeno, temveč tudi v zgornjih promotorskih regijah kodirajočih DNA-zaporedij evkariotskih genomov, kjer imajo domnevno vlogo regulatornih elementov. Številne mikrosatelitske ponovitve, odkrite pri človeku, so bile najdene tudi pri primatih, kar nakazuje na njihovo biološko funkcionalnost. Mikrosateliti v promotorskih regijah kodirajočih zaporedij DNA delujejo kot ojačevalci ekspresijskih vektorjev. Znano je, da lahko odsotnost mikrosatelitske ponovitve zmanjša regulatorno sposobnost promotorja. V nadaljevanju so s študijami ugotovili,

da lahko kratki nukleotidni in ponavljajoči se motivi v zgornjih aktivnih mestih ekspresijskih vektorjev služijo kot mesto vezave regulatornih proteinov. Predstavljene so bile tudi študije o vplivu dolžine mikrosatelitov na fenotipsko raznolikost (Kashi & Soller, 1999).

ZASTOPANOST MIKROSATELITOV PRI RASTLINAH

Podrobnejši pregled zastopanosti mikrosatelitov v genomu višjih rastlin sta med prvimi podala Morgante & Olivieri (1993), ki sta preučila pogostost pojavljanja dinukleotidnih in trinukleotidnih mikrosatelitskih ponovitev. Pri pregledu podatkovnih baz nukleotidnih zaporedij sta ugotovila, da se tip AT ponovitve najpogosteje pojavlja in sestavlja kar 74% vseh dinukleotidnih mikrosatelitov. Sledila mu je ponovitve GT/AC s 24-odstotno zastopanostjo, medtem ko je ponovitve AC/GT sestavljala le 1% vseh dinukleotidnih ponovitev. Dinukleotidne ponovitve CG avtorja nista zasledila. Med trinukleotidnimi ponovitvami sta bila motiva TAT in TCT najpogostejša. Pregled mikrosatelitov pri 34 različnih rastlinskih vrstah je pokazal, da so le ti v genomu pogosti in se pojavljajo na vsakih 50 kbp. V raziskavi pogostosti mikrosatelitov in tipov mikrosatelitskih ponovitev pri različnih evkariotskih genomih Tóth *et al.* (2000) odkrivajo, da tri- in heksanukleotidne ponovitve mikrosatelitov prevladujejo v eksonih, saj izguba ali pridobitev take ponovitve ne poruši bralnega okvirja. Pojavljanje drugih tipov mikrosatelitov v medgenskih regijah in intronih pa je taksonomsko specifično. O podobnih izsledkih poročajo še Metzgar *et al.* (2000). V nekodogenih regijah obstajajo mono-, di- tri-, tetra- in heksanukleotidni mikrosateliti, za katere veljajo podobni mutacijski in selekcijski procesi. V kodogenih regijah se v večji meri pojavljajo tri- in heksanukleotidni mikrosateliti, ki so izpostavljeni močnejšim in bolj specifičnim selekcijskim pritiskom. V novejši raziskavi so Morgante *et al.* (2002) preučili zastopanost mikrosatelitskih ponovitev v genomskih in EST (Expressed Sequence Tags – izražena nukleotidna zaporedja) zaporedjih repnjakovca (*Arabidopsis thaliana*), riža, soje, koruze in pšenice. Odkrili so, da je frekvenca pojavljanja mikrosatelitov obratno sorazmerna z velikostjo genoma in deležem ponavljajoče se DNA, in da ostaja konstantna v kodogenem delu genoma. Mikrosateliti so večinoma pojavljajo v regijah, ki predstavljajo nedavno povečanje genoma pri rastlinah, njihova frekvenca je večja v prepisanih regijah, posebno v neprevedenem delu mRNA, kjer je lahko večja celo za 3-krat. Pri vseh rastlinah, ki so bile vključene v analizo, pa je frekvenca mikrosatelitov znatno večja v knjižnici EST, kjer so odkrili najpogostejšo ponovitve AG/CT in najmanjšo AT. Song *et al.* (2002) so ugotovili, da je med trinukleotidni mikrosateliti najpogostejši in tudi najbolj polimorfen pri pšenici motiv TAA. V nadaljevanju McCouch *et al.* (2002) poročajo o zastopanosti mikrosatelitov pri rižu, kjer je najpogostejši

motiv GA, sledita mu motiva AT in CCG. Najdaljši so bili mikrosateliti z motivom AT, najkrajši pa s ponovitvijo GA.

TEHNIKA NAMNOŽEVANJA MIKROSATELITSKIH LOKUSOV

Princip tehnike mikrosatelitskih markerjev se od tehnika AFLP in RAPD razlikuje v tem, da se v verižni reakciji s polimerazo namesto naključnih lokusov namnožujejo znani lokusi. Če je znano nukleotidno zaporedje obrobne regije mikrosatelita, se lahko izdelata lokusno specifična začetna oligonukleotida, običajno dolžine 18–25 bp, ki omogočata namnožitev mikrosatelitske regije. Namnoženi aleli se ločijo z elektroforezo v poliakrilamidnem gelu ali polimeru visoke ločljivosti, za zaznavanje mikrosatelitov pa se uporablja radioaktivnost ali barvanje s srebrom. Popularna je tudi uporaba fluorescentno označenih začetnih oligonukleotidov in zaznavanje namnoženih alelov z avtomatsko lasersko napravo, ki omogoča hitro nadaljnjo obdelavo rezultatov (Kozjak *et al.*, 2003b; Štajner *et al.*, 2005). Fluorescentno označevanje molekul DNA običajno zviša ceno analiz, vendar je danes na voljo tehnika ekonomičnega fluorescentnega označevanja molekul PCR (Schuelke, 2000), ki je bila preizkušena in uspešno uporabljena pri namnoževanju in zaznavanju mikrosatelitov kač (Scott *et al.*, 2001) in oljke (Bandelj *et al.*, 2004a).

LASTNOSTI MIKROSATELITOV IN UPORABNOST V GENETSKIH ŠTUDIJAH

Mikrosateliti združujejo lastnosti različnih markerjev, zaradi česar so izredno atraktivni za genetske študije rastlin. Poleg visoke pogostosti pojavljanja in enakomerne razpršenosti v evkariotskih genomih jih odlikujejo še kodominantna narava, hipervariabilnost, visoka stopnja polimorfizma ter informativnost (Morgante & Olivieri, 1993; Powell *et al.*, 1996a; Weising *et al.*, 1998). Prednost uporabe mikrosatelitskih markerjev je tudi v možnosti avtomatiziranja postopka. Robustnost jim pripisujejo zaradi dobre ponovljivosti rezultatov (Powell *et al.*, 1996b; Jones *et al.*, 1997).

Rezultati genotipizacije rastlin z mikrosateliti so med laboratoriji primerljivi, nekaj odstopanj pri dolžini alelov pa je vendarle možno zaslediti zaradi različnih postopkov ločevanja in detekcije namnoženih markerjev (Weber, 1990). Bowers *et al.* (1996) so pri primerjavi dolžin alelov zaznanih s srebrom in dolžin avtomatskega fluorescentnega zaznavanja odkrili razlike v velikosti od 1 do 2 bp. Podobno ugotavljajo tudi Kozjak *et al.* (2003a), ki so pri genotipizaciji klonov vinske trte kultivarja 'Refošk' na dveh mikrosatelitskih lokusih pri barvanju s srebrom odkrili 2 bp daljša alela v primerjavi z avtomatskim fluorescentnim zaznavanjem na laserski napravi ALFexpress. Kline *et al.* (1997) so ugotavljali pri-

merljivost rezultatov mikrosatelitske analize v 34 laboratorijih in odkrili, da so rezultati primerljivi, če alele poimenujejo opisno. Pri primerjavi alelov, ki so jih označili z dolžino, je prihajalo do razlik, večjih od 5 bp.

Poleg različnih elektroforetskih sistemov in postopkov zaznavanja alelov so manjša neskladja v dolžini alelov lahko tudi posledica pojava senčnih fragmentov. Weber & May (1989) pojav razlagata kot posledico zdrsa polimeraze *Taq* in matrične vijačnice med namnoževanjem DNA v verižni reakciji s polimerazo. Murray *et al.* (1993) so z določitvijo nukleotidnega zaporedja senčnih fragmentov dinukleotidnega mikrosatelitskega lokusa ugotovili, da ti predstavljajo delecijo 2 bp, kar ustreza dolžini ene mikrosatelitske ponovitve. Pojav je izrazitejši pri dinukleotidnih mikrosatelitih in lahko povzroči nepravilno določitev dolžine alelov.

Med slabše lastnosti mikrosatelitskega markerskega sistema raziskovalci uvrščajo visoke stroške izolacije novih markerjev (Rafalski & Tingey, 1993; Squirrell *et al.*, 2003). Tradicionalne postopke, ki vključujejo izdelavo delne genomske knjižnice, kloniranje in hibridizacijsko preverjanje velikega števila rekombinantnih klonov, zamenjujejo novejša tehnika, ki vključujejo izdelavo genomske knjižnice, obogatene z mikrosateliti (Jakše & Javornik, 2001). Uspešnost izolacije mikrosatelitov je odvisna od več korakov, od priprave genomske knjižnice pa vse do izdelave parov začetnih oligonukleotidov, ki imajo sposobnost namnoževanja specifičnih lokusov s polimorfnimi aleli (Squirrell *et al.*, 2003).

Ko so mikrosateliti za določeno vrsto že poznani, se lahko uporabijo tudi za genetske analize sorodnih vrst, kar zniža stroške analiz, saj izdelava genomskih knjižnic v tem primeru ni potrebna. Obrobna nukleotidna zaporedja mikrosatelita so lahko med sorodnimi vrstami ohranjena, zato nekateri začetni oligonukleotidi, pripravljani za eno vrsto, uspešno namnožujejo tudi domnevno ortologno regijo DNA druge vrste. Namnoženi produkti PCR pričakovane dolžine ne zagotavljajo nujno obstoj mikrosatelitov in dovolj velikega polimorfizma (Huang *et al.*, 1998). Peakall *et al.* (1998) so z določitvijo nukleotidnega zaporedja dognali, da so razlike med aleli različnih vrst kompleksnejše, saj se ne razlikujejo samo v spremembi števila ponovitev osnovnega motiva, temveč tudi v strukturi mikrosatelita. Uspešnost medvrstne uporabe mikrosatelitskih markerjev se zmanjšuje s povečevanjem filogenetske oddaljenosti vrst (Schlötterer, 1998).

Uporaba začetnih oligonukleotidov sorodnih vrst za namnoževanje mikrosatelitskih regij je lahko povezana tudi s pojavom ničtih alelov (izpad namnožitve alela). Za nastanek ničtih alelov so odgovorne mutacije na mestih prileganja začetnih oligonukleotidov, ki preprečijo vezavo začetnih oligonukleotidov in s tem namnožitev mikrosatelita. Posledica so spremenjene frekvence alelov in genotipov, kar lahko privede do presežka homozigotov in podcenitve heterozigotnosti preučeva-

Tab. 1: Kronološka predstavitev genetskih raziskav oljke, pri katerih so bili uporabljeni mikrosatelitski markerji.
Tab. 1: Chronological presentation of genetics investigations of olives with the aid of microsatellite markers.

Cilji raziskave	Opis raziskave	Referenca
Izolacija in karakterizacija mikrosatelitov	Identifikacija in karakterizacija 15-ih MS lokusov oljke (ssrOeUA-DCA).	Sefc <i>et al.</i> , 2000
Izolacija in karakterizacija mikrosatelitov	Identifikacija in karakterizacija 5-ih MS lokusov oljke (IAS-oli).	Rallo <i>et al.</i> , 2000
Genotipizacija oljčnih sort	Preučili identiteto dveh sort iz IT in CA (Oblonga in Frantoio) s 5 MS lokusi. Ugotovili identičnost sort na vseh lokusih.	Barranco <i>et al.</i> , 2000
Izolacija in karakterizacija mikrosatelitov	Razvili 20 novih MS markerjev in predstavili karakterizacijo lokusov na 16-ih sortah (GAPU).	Carriero <i>et al.</i> , 2002
Izolacija in karakterizacija mikrosatelitov	Identifikacija 30 MS lokusov in karakterizacija lokalnih oljčnih sort v Italiji (UDO).	Cipriani <i>et al.</i> , 2002
Izolacija in karakterizacija mikrosatelitov	Identificirali 7 MS lokusov (EMO).	De la Rosa <i>et al.</i> , 2002
Genotipizacija oljčnih sort z mikrosatelitskimi markerji	Genotipizirali oljčne sort iz nacionalnega kolekcijskega nasada. Za genotipizacijo uporabili 14 MS lokusov.	Bandelj <i>et al.</i> , 2002b
Primerjalna študija RAPD, AFLP in MS tehnik pri identifikaciji in ugotavljanju sorodnostnih odnosov oljčnih sort	Preučili informativnost posameznega markerskega sistema. V analizo vključili 32 sort. Uporabili 8 predhodno objavljenih MS lokusov.	Belaj <i>et al.</i> , 2003
Izdelava genetske karte	Za kartiranje uporabili RAPD, AFLP, RFLP in MS markerje. Uporabili MS lokuse bližnjih sorodnikov oljke.	De la Rosa <i>et al.</i> , 2003
Namnoževanje MS oljke pri sorodnih vrstah znotraj rodu <i>Olea</i>	S 4-mi MS lokusi dosegli uspešno namnoževanje MS pri 13-ih različnih vrstah in podvrstah rodu <i>Olea</i> . Ugotovili visok polimorfizem in preučili sorodnost med vrstami.	Rallo <i>et al.</i> , 2003
Vrednotenje genetske raznolikosti in preučevanje sorodnosti oljčnih sort	Preučili 19 oljčnih sort z uporabo 14-ih MS lokusov. Predstavili informacijske vrednosti lokusov.	Bandelj <i>et al.</i> , 2004b
Izdelava integrirane genetske karte	190 markerjev (MS, RAPD, SCAR) uporabili za konstrukcijo karte, od tega 10 MS markerjev.	Wu <i>et al.</i> , 2004
Aplikacija MS za preverjanje pristnosti ekstra deviških oljčnih olj	Izolacija DNA iz komercialnih oljčnih olj in namnoževanje MS. Primerjava genetskih profilov sort z aleli, odkritih v oljčnem olju. Poročanje o uspešnosti metode MS v "forenziki" oljčnih olj.	Breton <i>et al.</i> , 2004
Klonska variabilnost	Analizirali variabilnost 130-ih vzorcev oljk. Genotipizacijo opravili na 14-ih MS lokusih. Pri več kot 60% vzorcih ugotovili homonime ali napačno označitev dreves v kolekciji in ugotovili visoko stopnjo variabilnosti znotraj oljčnih sort.	Lopes <i>et al.</i> , 2004
Starševska analiza	Uporabili 8 MS za genotipizacijo 23 oljčnih sort, potencialnih za uporabo v žlahtnjiteljskih programih. 4 MS uporabili za testiranje križancev.	De la Rosa <i>et al.</i> , 2004
Genotipizacija oljčnih sort in preučevanje genetske raznolikosti oljk	Preučili 46 akcesij 30-ih sort iz Sicilije (IT). V analizo vključili 12 MS lokusov.	La Mantia <i>et al.</i> , 2005
Preučevanje sorodnostnih odnosov in identifikacija sort	Preučeni 111 akcesij 60-ih oljčnih sort z markerji AFLP in MS. Uporabili 27 MS lokusov, izdelali dendrogram in preučili sposobnost ločevanja sort z dvema markerskima sistemoma.	Montemurro <i>et al.</i> , 2005
Aplikacija MS za preverjanje pristnosti ekstra deviških oljčnih olj	Izolacija DNA iz komercialnih oljčnih olj in namnoževanje MS. Uporabili 6 MS lokusov, izdelali začetne oligonukleotide za ugnezden PCR, uspešno namnoževanje MS, daljših od 188 bp.	Testolin & Lain, 2005
Upravljanje kolekcije oljk in identifikacija sort v Italiji	Preučili raznolikost 39 akcesij oljk iz Apulie (IT). Mikrosatelitom določili nukleotidno zaporedje in vsako sorto opisali s številom ponovitev osnovnega motiva MS. Uporabili 5 MS lokusov.	Muzzalupo <i>et al.</i> , 2006

nega lokusa. Obstoj ničtih alelov se lahko potrdi le s segregacijsko analizo. Pojavu se lahko izognemo z izdelavo novih specifičnih začetnih oligonukleotidov na novih mestih obrobnih zaporedij, če je to mogoče.

Za markerje, ki se uporabljajo na nivoju kromosomov pri kartiranju genoma, je pomembno, da so številčni in da se enakomerno pojavljajo v genomu. Tipičen mikrosatelitski lokus izpolnjuje oba kriterija, zato so mikrosateliti idealno orodje za kartiranje genoma. Zelo učinkoviti so tudi pri kartiranju lokusov, vezanih na kvantitativne lastnosti (QTL, Quantitative Trait Locus) (Chambers & MacAvoy, 2000).

Mikrosateliti so zaradi hipervariabilnosti idealno orodje tudi za molekulska identifikacija posameznikov. Vsak posameznik ima svojevrsten vzorec alelov, ki je osebno specifičen. Tehnika genotipizacije se rutinsko uporablja v sodno medicinskih raziskavah pri prepoznavanju oseb in ugotavljanju sorodstvenih vezi (Zupančič, 1998). Tudi pri rastlinah so mikrosateliti primerni za genotipizacijo in identifikacijo sort, kultivarjev, klonov in akcesij. S pomočjo mikrosatelitov se ugotavljajo nepravilnosti pri poimenovanju sort, ki so zaradi sinonimov in homonimov pogoste pri vegetativno množjenih rastlinah.

Mikrosateliti so bili v rastlinski genetiki uspešno uporabljeni tudi pri ugotavljanju genetske sorodnosti. Ker se dedujejo kodominantno, so idealno orodje za starševske analize in analize rodovnikov. S pomočjo mikrosatelitov se pridobivajo informacije o žlahtnjenju rastlin, o nastanku in strukturi populacij rastlin ter njihovi domestikaciji. Kronološki pregled raziskav o razvoju mikrosatelitskega markerskega sistema in njegove aplikacije v molekularno-genetskih raziskavah pri oljki je predstavljen v Tabeli 1.

PREDSTAVITEV KARAKTERISTIK OBJAVLJENIH MIKROSATELITOV OLJKE

Med letoma 2000 in 2006 je 5 raziskovalnih skupin poročalo o identifikaciji 77-ih mikrosatelitskih lokusov. Sefc *et al.* (2000) so pregledali genomsko knjižnico s sondami GA in CA in identificirali 20 mikrosatelitov z motivom GA, 4 z motivom CA in 5 s sestavljenim motivom CA-GA. Začetne oligonukleotide so izdelali za 28 lokusov, mikrosatelite pa uspešno namnožili na 15-ih lokusih. Karakterizacijo lokusov so predstavili v skupini 38 sort oljk iz Španije in 9 iz Italije.

Lokusi serije *ssrOeUA-DCA* so bili med prvimi objavljenimi, zato so bili tudi največkrat uporabljeni v genetskih študijah oljk. Molekulska karakterizacija oljčnih sort na 14-ih lokusih *DCA* je bila opravljena v Sloveniji (Bandelj *et al.*, 2004b) in na Portugalskem (Lopes *et al.*, 2004). Število namnoženih mikrosatelitov se med študijami razlikuje, saj je bilo v analize vključeno različno število sort različnega geografskega izvora. V vseh treh študijah (Sefc *et al.*, 2000; Bandelj *et al.*, 2004b;

Lopes *et al.*, 2004) je bila opažena heterozigotnost nižja od pričakovane na lokusih *DCA4*, *DCA11* in *DCA13*, kar nakazuje na možnost obstoja ničtih alelov. Najvišja opažena heterozigotnost je bila ugotovljena na lokusih *DCA3*, *DCA8*, *DCA9*, *DCA14*, *DCA16* in *DCA18*. V povprečju je bila opažena heterozigotnost v treh raziskavah visoka (0,722), kar kaže na veliko genetsko variabilnost oljk. Zohary & Spiegel-Roy (1975) menita, da so gojeni kloni oljk ekstremno heterozigotni. Pred domestikacijo so se oljke množile spontano s križanji, kar je bil razlog za povečano heterozigotnost, ki je rastlinam omogočila preživetje. V določenem obdobju pa je generativno razmnoževanje prešlo v vegetativno, tako da je heterozigotnost ostala fiksirana.

Informacijska vrednost polimorfizma (PIC vrednost) je odvisna od števila alelov in njihove frekvence na posameznem lokusu (Botstein *et al.*, 1980). Na osnovi povprečne vrednosti PIC (0,675) je bilo ugotovljeno, da so mikrosatelitski lokusi serije *DCA* zelo informativni. Med zelo informativne (PIC > 0,5) so se uvrstili vsi lokusi razen *DCA5* in *DCA13*, 8 lokusov (*DCA3*, *DCA4*, *DCA7*, *DCA9*, *DCA10*, *DCA14*, *DCA16* in *DCA17*) pa je izpolnjevalo tudi kriterij o primernosti lokusa za kartiranje (PIC > 0,7) (Bandelj *et al.*, 2004b).

Na lokusih *DCA4* in *DCA14* je bilo ugotovljeno kompleksno namnoževanje mikrosatelitov in odmik od pričakovanega dialelnega elektroforetskega vzorca, ki je običajen za diploidne organizme (Bandelj *et al.*, 2004b). Odmik se je pokazal v namnoževanju tretjega alela, kar je lahko posledica namnoževanja dodatnega lokusa. Ancestralne duplikacije kromosomov in poliploidni ali alopoliploidni značaj rastlinske vrste so po navedbah iz literature največkrat vzrok večlokusnega namnoževanja mikrosatelitov. Pri oljki Cipriani *et al.* (2002) poročajo, da 17% začetnih oligonukleotidov na novo izoliranih mikrosatelitov verjetno namnožuje dva različna lokusa. Avtorji menijo, da visoka frekvenca podvojenih DNA regij nakazuje na možnost v celoti podvojenega genoma, vendar njihovi rezultati ne zadostujejo, da bi ugotovili, ali je oljka poliploidnega ali alopoliploidnega značaja.

Pojav dominancije kratkega alela, ki se kaže v preferenčnem namnoževanju kratkih alelov (Wattier *et al.*, 1998), je bil opažen na lokusih *DCA1*, *DCA10* in *DCA17*. Pri heterozigotnih genotipih, kjer sta bila navzoča kratek in dolg alel, je bila po barvanju s srebrom opažena večja intenziteta krajšega alela v primerjavi z daljšim, kar je verjetno posledica kompeticije namnoževanja kratkih in dolgih alelov v verižni reakciji s polimerazo (Bandelj *et al.*, 2004b). Selektivno namnoževanje alelov na takih lokusih lahko privede do podcenitve opažene heterozigotnosti in posledično vpliva na rezultate genetske analize.

Z obogatitvenim postopkom genomske knjižnice oljke z motivom GA so Rallo *et al.* (2000) z radioaktivno označeno sondo identificirali 24 klonov z mikrosatelitom. 55% klonov je vsebovalo popolne mikrosatelite,

30% nepopolne, pri 15% pa je bil ugotovljen sestavljen motiv mikrosatelita. Odkrili so mikrosatelitske motive CA, TA, GAA v kombinaciji z GA v sestavljenem mikrosatelitu, v enem primeru pa poročajo tudi o heksanukleotidnem motivu AGAGGG. Lokusno specifične oligonukleotide so pripravili za 13 mikrosatelitskih regij. Namnoževanje mikrosatelitov so preizkusili na 46 oljčnih sortah različnega geografskega izvora in ugotovili, da le 5 lokusov namnoži polimorfne produkte PCR v pričakovnem velikostnem območju (IAS-oli06, IAS-oli11, IAS-oli12, IAS-oli17, IAS-oli22). Na dveh lokusih niso dosegli namnoževanja alelov, pri 4 so ugotovili kompleksno in nespecifično namnoževanje, dva lokusa pa sta bila monomorfna. Skupno število namnoženih alelov v skupini 46 oljčnih sort na 5-ih mikrosatelitskih lokusih je bilo 26. Največ alelov (9) so ugotovili na lokusu IAS-oli11, najmanj (4 in 3) pa na lokusih IAS-oli17 ter IAS-oli06 in IAS-oli22. Lokusi z manjšim številom alelov so zaradi večje verjetnosti identičnosti genotipov manj primerne za identifikacijo sort. Dedovanje mikrosatelitov so preverili z genotipizacijo potomcev križanja 'Leccino' X 'Dolce Agogia' in potrdili Mendlovsko dedovanje. Pri karakterizaciji izoliranih mikrosatelitov avtorji poročajo o pojavu ničtih alelov, senčnih fragmentov in kompleksnega namnoževanja lokusov. Na lokusu IAS-oli12 so odkrili ničte alele, ki so verjetno posledica mutacij na mestih prileganja začetnih oligonukleotidov. Namnoževanje nespecifičnih produktov PCR so ugotovili na lokusu IAS-oli08, zato so ga izključili iz nadaljnjih analiz. Pojav senčnih fragmentov, ki so bili izrazitejši pri zaznavanju alelov z avtomatizirano sekvenčno napravo ABI 310, so avtorji opazili na lokusu IAS-oli11.

Genomsko knjižnico oljke, obogateno z motivom GA, so pripravili tudi Carriero *et al.* (2002). Avtorji so identificirali 54 pozitivnih klonov, med katerimi je 22 vsebovalo popolne dinukleotidne mikrosatelite, 15 nepopolne in 5 popolne trinukleotidne mikrosatelite. Preostalih 12 klonov so klasificirali med kompleksne mikrosatelite. Začetne oligonukleotide so izdelali za 20 mikrosatelitskih lokusov in na 10-ih dosegli uspešno namnoževanje polimorfni alelov v skupini 16-ih sort oz. 20-ih akcesij. Na preostalih lokusih niso ugotovili polimorfni markerjev. Najmanj alelov so odkrili na lokusih GAPU12 (2) in GAPU11e17 (3). Sledila sta jima lokusa GAPU45 in GAPU59 s štirimi aleli. Največ alelov so ugotovili na lokusu GAPU101 (9), sledili so mu lokusi GAPU103A, GAPU47 in GAPU89 z 8 aleli. Skupno število namnoženih alelov pri 20-ih akcesijah oljk je bilo 57, v povprečju 5,7 alela na lokus. S predstavljenimi mikrosateliti so avtorji preučili genetsko sorodnost oljk italijanskega izvora, o natančnejši informacijski vrednosti mikrosatelitov pa niso poročali.

Cipriani *et al.* (2002) so določili nukleotidno zaporedje 60 pozitivnih kolonij dveh obogatenih genomskih knjižnic (AC/GT in AG/CT) oljke. Na 30 mikrosatelitskih lokusih so dosegli uspešno namnoževanje alelov v pri-

čakovani dolžini. Karakteristike mikrosatelitov so preučili na 12-ih sortah oljk italijanskega izvora. 28 mikrosatelitskih lokusov je bilo polimorfni, na dveh pa polimorfizma niso ugotovili (UDO99-003, UDO99-022). Z začetnimi oligonukleotidi UDO99-007, UDO99-009, UDO99-022, UDO99-034, UDO99-036 sta se istočasno namnožila po dva lokusa. V povprečju so na lokusu odkrili po 3 alele, kar je v primerjavi z drugimi objavljenimi mikrosateliti oljke razmeroma malo. Na 7 lokusih sta bila ugotovljena le po 2 alela, na 9 lokusih so odkrili po 3 alele, na 3 lokusih 4 oz. 5 alelov. Kljub nizkemu številu namnoženih mikrosatelitov v 12-ih sortah oljk so avtorji analizirane sorte zlahka ločili. Podrobneje so preučili in primerjali sorti 'Casaliva' in 'Frantoio' ter 'Les' in 'Leccino'. Na osnovi genotipizacije večjega števila vzorcev sort 'Casaliva' in 'Frantoio' avtorji menijo, da 'Casaliva' pripada sortni populaciji 'Frantoio', vendar sta sorti genetsko različni. Enako velja tudi za sorti 'Leccino' in 'Les'.

De la Rosa *et al.* (2002) so predstavili še 7 novih mikrosatelitskih lokusov (EMO), ki so jih identificirali iz knjižnice, obogatene z dinukleotidnimi motivi GA in GT. Začetne oligonukleotide so izdelali za 13 mikrosatelitskih lokusov, vendar s 5-imi niso namnožili alelov v pričakovani dolžini, 2 lokusa pa sta bila monomorfna. Karakterizacijo novih mikrosatelitov so predstavili v skupini 23-ih sort. V povprečju so odkrili 6,4 alela na lokus, najmanj na lokusu EMOL (2), največ pa na lokusu EMO2 (9). Informacijsko vrednost polimorfizma lokusov so podali tudi z izračunom pričakovane in opažene heterozigotnosti. Najnižjo vrednost so opazili na lokusu z najmanjšim številom alelov EMOL. Z začetnimi oligonukleotidi lokusa EMO30 so pri sorti Arbequina namnožili 4 alele, kar nakazuje na istočasno namnožitev več lokusov. Uspešno namnoževanje oljčnih mikrosatelitov so ugotovili tudi pri sorodnih vrstah oljke; forziciji (*Forsythia intermedia*), velikem jesenu (*Fraxinus excelsior*), jasminu (*Jasminum beesianum*), osmantu (*Osmanthus heterophyllus*) in španskem bezgu (*Syringa vulgaris*).

UPORABNOST MIKROSATELITOV V GENETSKIH ŠTUDIJAH OLJK

Identifikacija in genotipizacija oljčnih sort

Enostavno, vegetativno razmnoževanje oljke je omogočilo intenzivno izmenjavo rastlinskega materiala v državah Sredozemlja, kar je povzročilo veliko zmedo pri imenovanju sort in klonov. Sinonimi in homonimi pomenijo oviro pri vrednotenju genskih virov oljke, zato je karakterizacija genotipov z molekulskimi markerji najbolj primeren način za pravilno identifikacijo sort, ki je ključnega pomena pri upravljanju kolekcij, ločevanju sadilnega materiala v drevesnicah in pri vzgoji certificiranih sadik sort in klonov. Zaradi enostavnega vrednotenja alelnih profilov in zagotavljanja ponovljivosti

rezultatov med laboratoriji so mikrosateliti najprimernejše orodje za ločevanje sort.

Prvo obsežnejše delo na področju identifikacije oljčnih sort v Sloveniji je bilo prikazano v delu Bandelj *et al.* (2002b). V raziskavi je bilo določeno najmanjše število mikrosatelitov serije *ssrOeUA-DCA* (Sefc *et al.*, 2000), s katerimi je bilo mogoče ločiti 19 oljčnih sort iz nacionalnega kolekcijskega nasada oljk v Strunjanu. Najprimernejši markerji so bili izbrani na osnovi naslednjih kriterijev: namnoževanje nekompleksnih elektroforetskih vzorcev s kakovostnimi PCR produkti, stabilna struktura mikrosatelita in visoka informacijska vrednost markerjev. Verjetnost enakosti genotipov (PI), ki se uporablja kot merilo ločevanja genotipov, je pokazala nizko informacijsko vrednost lokusov DCA1, DCA5, DCA13 in DCA15. Pri omenjenih lokusih so bile vrednosti PI višje, zato jih uvrščamo med markerje s slabšo sposobnostjo ločevanja in so manj primerni za identifikacijo. Največja sposobnost ločevanja genotipov oljk je bila odkrita pri lokusu DCA16, kjer je bila vrednost PI najnižja (0,073). Na tem lokusu je bilo ugotovljenih 9 različnih alelov, največ učinkovitih alelov (6,6) in največ različnih genotipov (14). Visoko informacijsko vrednost lokusa dokazuje tudi visoko število svojevrstnih genotipov (11). Dobro sposobnost ločevanja posameznikov je imel tudi lokus DCA10 z vrednostjo PI 0,078 in na katerem je bilo odkritih največ sortno specifičnih alelov (7), ki omogočajo takojšnjo identifikacijo specifičnega genotipa. Med preostalimi lokusi je bil glede na število ugotovljenih edinstvenih genotipov (8) in kakovost PCR produktov za identifikacijo izbran še lokus DCA3. Na osnovi upoštevanih kriterijev so bili med 14-imi mikrosatelitskimi lokusi za identifikacijo izbrani DCA3, DCA10 in DCA16, katerih kombinacija je zagotavljala svojevrstne alelne profile, karakteristične za specifično sorto.

Barranco *et al.* (2000) so preučili uporabnost mikrosatelitskih markerjev pri ugotavljanju sinonimov sort. V analizo so vključili sorti 'Oblonga' iz Kalifornije in 'Frantoio' iz Italije. Pri morfološki karakterizaciji obeh sort v genski banki so odkrili, da sta sorti fenotipsko identični, zato so ju primerjali z mikrosatelitskimi markerji. Identičnost alelnih profilov so odkrili na petih lokusih (IAS-oli06, IAS-oli11, IAS-oli12, IAS-oli17, IAS-oli22). Na osnovi rezultatov molekulske in morfološke analize so potrdili, da sta sorti genotipsko identični.

Rallo *et al.* (2000) so s 5-imi lokusi (IAS-oli) ločili 95% od 46 analiziranih sort. Svojevrstne alele, ki omogočajo takojšnjo identifikacijo, so zaznali na dveh lokusih pri 3 sortah, kar je v primerjavi s serijo mikrosatelitov *ssrOeUA-DCA*, kjer je bilo ugotovljenih kar 25 sortno specifičnih alelov pri 10-ih sortah (Bandelj *et al.*, 2002b), razmeroma malo. Slednje potrjuje visoko informacijsko vrednost lokusov serije *ssrOeUA-DCA*. De la Rosa *et al.* (2002) ravno tako poročajo o dobri ločevalni sposobnosti mikrosatelitov serije EMO, saj so s 4-imi lokusi (EMO2, EMO3, EMO13 in EMO30) ločili vseh 23 oljčnih sort.

Preučevanje genetske variabilnosti in sorodnosti oljk z mikrosateliti

Inventarizacija in ohranjanje genskih virov oljk ostaja prioriteta sodobnega oljkarstva. Poznavanje genetske variabilnosti je pomembno pri načrtovanju žlahtnjenja oljke, saj so pomanjkljive informacije o genskih virih glavni razlog, da oljka v preteklosti ni bila vključena v večje žlahtniteljske programe. Z namenom pospeševanja vzgoje sort, ki bi bile bolj prilagojene sodobnim agronomskim tehnologijam, v državah Sredozemlja ustanavljajo nacionalne in mednarodne kolekcije, kjer potekajo postopki vrednotenja in identifikacije genetskega materiala oljke.

Za ohranitev genskih virov oljke na Siciliji je bil v letu 1995 vzpostavljen kolekcijski nasad. Na osnovi predhodno objavljenih karakteristik mikrosatelitskih markerjev so La Mantia *et al.* (2005) napravili raziskavo genetske raznolikosti 46-ih vzorcev oljk, ki pripadajo skupini 30-ih sort. Genotipizacijo vzorcev so opravili na 12-ih mikrosatelitskih lokusih (DCA3, DCA4, DCA9, DCA16, GAPI101, GAPI59, UDO-008, UDO-009, UDO-012, UDO-024, UDO-039, UDO-043), izbranih na osnovi sposobnosti odkrivanja visokega polimorfizma, odsotnosti pojava senčnih fragmentov in nekompleksnega namnoževanja alelov. Z izbranimi lokusi so v skupini analiziranih oljk namnožili 119 mikrosatelitov, v povprečju so ugotovili 9,5 markerja na lokus. Za lokus UDO-009 je bila ugotovljena nizka sposobnost ločevanja genotipov zaradi majhnega števila namnoženih markerjev in visoke frekvence ponavljanja treh alelov v skupini oljk. Pri tem lokusu so ugotovili tudi pojav fragmenta +1 bp, kar je preprečevalo pravilno določitev dolžine alelov. Na lokusih UDO-043 in DCA4 so opazili značilne vzorce združenih alelov, pojav ničtih alelov pa je bil ugotovljen na lokusih UDO-008 in UDO-039. Pri več kot 16-ih vzorcih so ugotovili sinonime. Na osnovi izračunanih koeficientov sorodnosti oljk so izdelali dendrogram in poskušali ugotoviti, ali se oljke s Sicilije genetsko razlikujejo od sort, ki uspevajo v drugih območjih Sredozemlja. Razmestitev sort v skupine ni pokazala večje genetske sorodnosti med oljkami glede na fenotipsko podobnost in geografsko območje gojenja, kar avtorji pojasnjujejo kot posledico prenašanja rastlinskega materiala oljk med Sicilijo in drugimi sredozemskimi državami. Z analizo so ugotovili tudi starševstvo dveh sort. Sorta 'Giarfara' je nastala s križanjem sort 'Nocellara del Belice' in 'Cacaridduni', medtem ko je sorta 'Pizzo di Corvo' križanec sort 'Nocellara Etnea' in 'Tonda Iblea'.

Avtorji mikrosatelitov GAPI (Carriero *et al.*, 2002) so markerje uporabili za preučitev genetske podobnosti 20 vzorcev oljk iz južne (Apulija, Kalabrija, Bazilika) in centralne Italije. Na osnovi izračunanih koeficientov podobnosti so z metodo UPGMA izdelali dendrogram, v katerem so bile sorte razdeljene v dve večji skupini. V prvi so se združile sorte, ki uspevajo na obali Ionskega

morja, druga skupina pa je bila razdeljena v dve manjši podskupini: kalabrijsko in apulijsko. Avtorji ugotavljajo, da so se sorte razvrstile v sorodnostne skupine glede na geografski izvor oljk.

V Sloveniji so bili mikrosateliti uporabljeni za ugotavljanje genetske sorodnosti oljčnih sort, ki uspevajo na območju Istre (Bandelj *et al.*, 2004b). Z molekularno raziskavo smo poskušali ugotoviti genetsko povezavo lokalnih sort z italijanskimi, saj je študija oljčne strukture konec 19. in v začetku 20. stoletja pokazala, da je sortiment oljk na območju Istre nastajal pod vplivom Italije, zaradi priseljevanja ljudi iz osrednje Italije na območje Beneške republike (Hugues, 1999). Podobnost je Hugues (1999) opazil tudi v poimenovanju sort. Za analizo so bili uporabljeni lokusi serije DCA (Sefc *et al.*, 2000) in na osnovi rezultatov genotipizacije je bila preučena genetska podobnost 19-ih oljčnih sort. Rezultati razvrščanja v skupine so pokazali, da je 'Črnica', ki je bila v preteklosti najbolj razširjena sorta v Slovenski Istri, genetsko podobna toskanski skupini sort, kar potrjuje domneve Huguesa (1999). Večja genetska podobnost sort je bila opažena pri sortah z večjimi plodovi. V to skupino so se uvrstile tudi nekatere lokalne istrske sorte z večjimi plodovi. Razen toskanske skupine sort pa ni bilo opaziti večje genetske povezanosti sort glede na geografski izvor.

Genetsko variabilnost 130 vzorcev oljk, ki pripadajo skupini 67 sort, so z mikrosateliti serije DCA preučili Lopes *et al.* (2004). Ugotovili so, da obstaja velika variabilnost znotraj sort, saj so pri nekaterih oljkah odkrili razliko v več kot 15% namnoženih alelov. Z genotipizacijo pri nekaterih sortah niso potrdili sinonimov, omenjenih v podatkovni bazi FAO. Pri več kot 60% vzorcev pa so ugotovili homonime ali napačno označitev vzorcev v kolekciji. Mikrosateliti so se v študiji pokazali kot primerno orodje pri upravljanju kolekcij, identifikaciji sort in klonov ter reševanju sinonimov in homonimov.

Montemurro *et al.* (2005) so preučili genetsko podobnost 111-ih akcesij oljk (60 sort) iz Italije, Španije, Francije in Grčije. Polimorfizem in genetsko podobnost so analizirali s tremi kombinacijami AFLP markerjev in z 27-imi mikrosatelitskimi lokusi. S kombinacijo obeh markerskih sistemov so ločili vse genotipe oljk. V dendrogramu so bile sorte razvrščene v tri večje skupine glede na uporabnost plodov: za olje, za namizne oljke in kombinacija obeh.

Mikrosateliti gojenih oljk se zaradi ohranjenosti nukleotidnih zaporedij lahko uporabljajo tudi za preučevanja genetske variabilnosti na nivoju vrst iz rodu *Olea*. Taksonomsko je oljka (*Olea europaea* L.) razdeljena v 4 podvrste, ki uspevajo v Sredozemlju, Afriki in Aziji (subsp. *europaea*, *cuspidata*, *laperrinei*, *cerasiformis*) (Green & Wickens, 1989), nedavno pa sta bili klasificirani še dve podvrsti (*guanchica in maroccana*) (Vergas *et al.*, 2001). Kompleks *Olea* so Rallo *et al.* (2003) preučili s 4-imi mikrosatelitskimi lokusi gojene oljke serije IAS-oli. S študijo so želeli preveriti in potrditi

ohranjenost mikrosatelitskih regij pri 15-ih vrstah in podvrstah rodu *Olea*. V analizo so vključili tudi 14 oljčnih sort. Namnoževanje vseh štirih mikrosatelitskih regij so dosegli pri 13-ih taksonih, 2 vrsti pa oljčnih mikrosatelitov nista namnožili. Velik polimorfizem namnoženih markerjev je omogočal nedvoumno identifikacijo večine vzorcev, skupno so odkrili 67 alelov in od tega je bilo več kot 50% svojevrstnih. Največ polimorfni markerjev je bilo opaženih na lokusu IAS-oli11, nekoliko manj pa na lokusih IAS-oli17 in IAS-oli22. Ti rezultati potrjujejo uporabnost lokusov serije IAS-oli za preučevanje filogenije oljke, zanimivo pa je tudi dejstvo, da so Rallo *et al.* (2000) pri preučevanju 46-ih sort z isto serijo mikrosatelitov ugotovili bistveno manj alelov (26). Rezultati razvrščanja vzorcev v sorodnostne skupine so pokazali, da imajo lokusi sorodnih vrst verjetno različno genetsko ozadje, zaradi katerega je težko določiti dejansko genetsko sorodnost med preučevanimi vrstami. Le z lokusom IAS-oli12 so dosegli logično razmestitev taksonov v podobnostne skupine, zato poudarjajo, da je za uspešnost ugotavljanja genetske podobnosti med vrstami in podvrstami oljke izbira ustreznega lokusa ključnega pomena. Znotraj vrste je dolžinski polimorfizem primerno merilo, pri večji oddaljenosti taksonov pa je treba predhodno preučiti mutacijski mehanizem in evolucijo mikrosatelita, sicer lahko izbira neustreznega lokusa privede do napačne interpretacije rezultatov. Kljub temu da so v študiji uporabili le 4 mikrosatelitske lokuse, je razvrstitev v sorodnostne skupine pokazala jasno ločitev med podvrstami in sortami. Na osnovi ugotovljenega polimorfizma je bila potrjena uporabnost lokusov za preučevanje genetske podobnosti v kompleksu *Olea*.

Genetsko raznolikost *Olea europaea* subsp. *laperrinei* sta z mikrosateliti preučila Baali-Cherif & Besnard (2005). Subsp. *laperrinei* je prvotno uspevala v saharskem gorovju, kasneje pa se je razširila še v druga afriška območja. Predvidevajo, da se je zaradi prilagajanja različnim in ekstremnim ekološkim razmeram izoblikovalo več ločenih populacij. Avtorja sta v raziskavo vključila 111 dreves podvrste *laperrinei* in 34 dreves podvrste *europaea* iz Alžirije. Na osnovi objavljenih karakteristik mikrosatelitov sta za analizo variabilnosti izbrala 8 lokusov gojene oljke (DCA1, DCA3, DCA8, DCA9, DCA14, DCA15, GAPA 45, EMO3) in lokus PA(ATT)₂ bližnjega sorodnika oljke (*Phillyrea angustifolia* L.). Lokusi so bili izbrani na osnovi števila namnoženih alelov in njihovih dolžin, da so lahko opravili namnoževanje več lokusov hkrati. Z namenom, da bi se izognili pojavu ničtih alelov, sta upoštevala tudi vrednosti opažene in pričakovane heterozigotnosti posameznih lokusov. Število namnoženih alelov je bilo pri obeh podvrstah *europaea* (85 alelov) in *laperrinei* (89 alelov) podobno. V skupini oljčnih sort podvrste *europaea* sta največ alelov (16) odkrila na lokusih DCA8, DCA9, sledili so jima lokusi DCA14 (13 alelov), EMO3 (12

alelov) in DCA1 (10 alelov). Najmanj alelov pa je bilo ugotovljenih na lokusu GAPU45 (2). Podobne rezultate sta dobila tudi pri analizi podvrste *laperrinei*. Zanimivo je, da sta na lokusu DCA1 pri tej podskupini odkrila kar 24 različnih alelov. Na tem lokusu smo pri preučevanju 19-ih oljčnih sort iz nacionalnega kolekcijskega nasada v Sloveniji ugotovili le 5 alelov (Bandelj *et al.*, 2004b), drugi dve skupini pa le po 4 alele (Sefc *et al.*, 2000; Lopes *et al.*, 2004). Število namnoženih alelov na lokus ni torej vedno zanesljivo merilo za izbiro najboljših lokusov za genetske analize oljke in je lahko v veliki meri odvisno od raznolikosti genetskega materiala, ki je vključen v raziskavo. Na lokusu DCA1 sta avtorja ugotovila tudi trialelni profil pri treh vzorcih populacije *laperrinei*, kar pripisujeta somatskim mutacijam in ohranitvi himerizma. Raziskava populacij podvrste *laperrinei* je pokazala, da je tudi znotraj majhnih populacij možno odkriti veliko variabilnost, kljub nespornemu načinu razmnoževanja.

Uporabnost mikrosatelitov oljke v žlahtnjiteljskih programih

Mikrosateliti se lahko rutinsko uporabljajo tudi v žlahtnjiteljskih programih oljk. De la Rosa *et al.* (2004) so mikrosatelite uporabili za testiranje starševstva potomcev štirih avtofertilnih sort in potomcev sedmih kontroliranih križanj, ki so jih opravili v Španiji v programu žlahtnjenja oljke. Za analizo so med poznanimi mikrosateliti izbrali 8 lokusov serije EMO (De la Rosa *et al.*, 2002) in DCA (Sefc *et al.*, 2000) in najprej opravili genotipizacijo 23-ih oljčnih sort. Avtorji so ocenili informacijsko vrednost lokusov na osnovi števila namnoženih alelov in sposobnosti ločevanja sort s kombinacijo alelov (genotipov) na posameznem lokusu. Največ sort so lahko ločili z lokusi EMO2 (11), EMO3 (10), DCA9 (16) in DCA18 (12), slabšo ločevalno sposobnost markerjev pa so opazili na lokusih EMO13, EMO30, EMO88 in EMO90. Lokuse z visoko informacijsko vrednostjo so nato uporabili za testiranje starševstva 149-ih potomcev. Nestarševske alele so ugotovili tako pri avtofertilnih rastlinah kot pri potomcih načrtovanih križanj. Pravilni alelni profili so bili ugotovljeni le pri treh kontroliranih križanj sort Picual in Arbequina. Z raziskavo so avtorji podali tudi nekaj pomembnih ugotovitev za načrtovanje križanj oljk. Ugotovili so, da je emaskulacija pri avtofertilnih sortah oljk nepotrebna in da je za zagotavljanje uspešnosti križanja potrebno opravevalne vrečke nameščati na materine rastline, preden se v zraku pojavi prvi pelod. Avtorji so 23 oljčnih sort na osmih lokusih predstavili z alelnimi profili v bp, kar bo v nadaljevanju omogočalo primerjavo rezultatov genotipizacije oljk med različnimi laboratoriji, kar pomeni velik prispevek k vzpostavljanju podatkovne baze za genotipizacijo oljke z mikrosatelitskimi markerji.

Preverjanje pristnosti sorte strukture oljčnih olj z oznako zaščiteno geografsko poreklo

Z Uredbo o zaščiti geografskih označb in označb porekla za kmetijske proizvode in živila (ES št. 510/2006) se oljna olja z geografskim poreklom pridobivajo iz določenega sortimenta, ki je za območje značilen. Tehnologija DNA ponuja obetaven način kontrole provenience oljčnega olja, saj je v vsakem olju prisotna DNA sort oljk, iz katerih je bilo olje pridobljeno (Breton *et al.*, 2004; Woolfe & Primrose, 2004). V Italiji (Muzalupo & Perri, 2002; Busconi *et al.*, 2003; Testolin & Lain, 2005; Pafundo *et al.*, 2005) in Franciji (Breton *et al.*, 2004) že poročajo o uspešni vzpostavitvi kontrole sledljivosti oljčnih olj z markerji DNA in aplikacije metode za preverjanje geografskega porekla. Raziskovalci pri tem poudarjajo, da je ključnega pomena ustrezna izbira molekularskih markerjev ter predhodno vzpostavljena podatkovna baza z opisi markerjev za sorte nekega pridelovalnega območja (Busconi *et al.*, 2003; Pasqualone *et al.*, 2004). Prve raziskave o uporabi mikrosatelitov pri določanju sort v oljčnem olju so pokazale, da so ti markerji primerni in najbolj perspektivni za genetsko kontrolo pristnosti oljčnih olj z geografskim poreklom (Breton *et al.*, 2004; Pasqualone *et al.*, 2004; Testolin & Lain, 2005).

Uporabnost mikrosatelitov pri kartiranju genoma oljke

Motivi za izdelavo genskih kart so lahko različni. Pri rastlinah se uporabljajo za kartiranje lokusov, povezanih s kvalitativnimi (enostavnimi) ali kvantitativnimi lastnostmi (QTL: Quantitative Trait Locus). Izdelana genska karta lahko rabi kot orodje, ki ga potrebujejo žlahtnjitelji pri načrtovanju procesa izboljšanja genskih virov rastlin. Gensko kartiranje temelji na principu, da se geni, ki so dovolj blizu na istem kromosomu, dedujejo vezano. Pri tem se ugotavlja pogostost rekombinacij, pri čemer se lahko oceni razdalja med geni ali genskimi markerji na istem kromosomu. Mikrosateliti so zaradi številčnosti v rastlinskih genomih zelo uporabni pri kartiranju.

Prvo vezano karto oljke so izdelali De la Rosa *et al.* (2003), v katero so vključili markerje RAPD, AFLP, RFLP in mikrosatelite. Analizo dedovanja so opravili na 95-ih potomcih psevdotestnega križanja dveh visoko heterozigotnih sort 'Leccino' in 'Dolce Agogia'. Pripravljeni karti sta povezali 249 markerjev s pokritostjo 2765 cM pri sorti 'Leccino' in 236 markerjev s pokritostjo 2445 cM pri sorti 'Dolce Agogia'. Zaradi prisotnosti manjših vezanih skupin in nevezanih markerjev se karti nista razdelili v 23 vezanih skupin, kot so pričakovali. Avtorji sklepajo, da uporabljeni markerji niso enakomerno razpršeni v genomu oljke.

Wu *et al.* (2004) so predstavili prvo integrirano karto oljke, ki so jo pripravili po principu psevdotestnega križanja sort 'Frantoio' in 'Kalamata'. V analizo so vklju-

čili 104 potomce F_1 generacije in preučili dedovanje 178 markerjev RAPD, 9 mikrosatelitov in 3 markerje SCAR, med katerimi je bil en povezan z odpornostjo na glivo pavjega očesa. Integrirana karta je vsebovala 101 lokus, ki so bili razdeljeni v 15 skupin s povprečno razdaljo med lokusi 10,2 cM. Po prehodu potomcev križanja v rodno obdobje nameravajo avtorji v obstoječo gensko karto vključiti še morfološke markerje agronomsko pomembnih lastnosti, kot so čas cvetenja, odpornost na bolezen ter kakovostne parametre oljčnega olja in plodov (npr. oljevitost). Vezana karta bo temelj za bodoče programe žlahtnjenja oljk in bo uporabljena za identifikacijo lokusov, ki določajo kvantitativne lastnosti (QTL), ter za preučevanje genoma oljke.

ZAKLJUČKI

Lastnosti in prednosti mikrosatelitskega markerskega sistema pred drugimi razpoložljivimi markerji so dobro poznane. Z razvojem mikrosatelitov oljke so se ti markerji vključili v različne genetske študije: genotipizacija in identifikacija oljčnih sort, ugotavljanje genetske variabilnosti klonov in sort, preučevanje genetske podobnosti in strukture oljk različnih geografskih območij, izdelava genskih kart in starševske analize. Mikrosateliti veliko obetajo tudi na področju kontrole sortne sestave oljčnega olja z zaščitenim geografskim poreklom. V identifikacijskih študijah se je pokazalo, da bi bilo treba pri oljki vzpostaviti poenoten postopek identifikacije genotipov in podatkovno bazo z opisi referenčnih sort na nivoju DNA. Izbira mikrosatelitov se zdi logična, saj bo s tem omogočena primerljivost rezultatov med laboratoriji. Podatkovna baza z opisi oljčnih sort na visoko informativnih lokusih bo prispevala k pospešeni identifikaciji in karakterizaciji genskih virov oljke, rešitvi sinonimov in homonimov ter ugotavljanju geografskega izvora oljk. Vzpostavitev podatkovne baze genotipov oljk pridelovalnih območij je nujno potrebna tudi z vidika zagotavljanja genetske kontrole oljčnih olj s kakovostnimi oznakami.

Uporaba mikrosatelitskega markerskega sistema v genetskih študijah vključuje tudi analize informativnosti lokusov, saj vsi objavljeni mikrosateliti niso primerni kot markerji v molekularno-genetskih študijah. Razlikujejo se v kakovosti namnoževanja alelov in sposobnosti odkrivanja polimorfizma. Iz tega vidika je pomembno objavljene markerje predhodno testirati in izbrati le najbolj informativne glede na cilj raziskave. Najpogostejši kriteriji pri izbiri lokusov so število namnoženih alelov, heterozigotnost lokusa, informacijska vrednost polimorfizma (PIC vrednost) in verjetnost identičnosti genotipov (PI vrednost). Izbira je lahko tudi kompleksnejša, če upoštevamo, da so nekatere karakteristike markerjev odvisne tudi od strukture mikrosatelita. Pojavi ničtih alelov in senčnih fragmentov ter večlokusno namnoževanje mikrosatelitov lahko privedejo do napačne interpretacije

rezultatov, zato je pri izbiri najprimernejših lokusov za analize treba upoštevati tudi te kriterije.

Med objavljenimi mikrosateliti oljke so kar 4 študije potrdile izredno visoko informacijsko vrednost lokusov serije *ssrOeUA-DCA* (Seřc *et al.*, 2000; Bandelj *et al.*, 2004b; Lopes *et al.*, 2004; La Mantia *et al.*, 2005). Če povzamemo, so bili lokusi DCA3, DCA9, DCA10 in DCA16 najprimernejši za identifikacijo oljčnih sort zaradi nizke verjetnosti identičnosti genotipov. Zavoljo nizke informacijske vrednosti in visoke verjetnosti identičnosti genotipov ter majhnega števila učinkovitih alelov so bili najslabši parametri variabilnosti opaženi pri lokusih DCA1, DCA5, DCA13 in DCA15. Verjetnost pojava ničtih alelov je bila največja pri lokusih DCA4, DCA11 in DCA13. Lokusa DCA4 in DCA14 namnožujeta kompleksne alelne profile, pri lokusih DCA1, DCA10 in DCA17 je bila ugotovljena dominanca kratkega alela (Bandelj *et al.*, 2004b), lokusa DCA11 in DCA17 pa imata nestabilno mikrosatelitsko strukturo (Seřc *et al.*, 2000).

V seriji mikrosatelitov IAS-oli (Rallo *et al.*, 2000) so bili ugotovljeni najboljši parametri variabilnosti pri dveh lokusih IAS-oli11 in IAS-oli12, slabši pa pri lokusih IAS-oli06, IAS-oli17 in IAS-oli22. Rezultati dveh študij (Rallo *et al.*, 2000, 2003) so pokazali, da so lokusi serije IAS-oli morda primernejši za raziskave kompleksa *Olea*, saj je bilo pri preučevanju različnih podvrst oljke ugotovljeno bistveno večje število markerjev (67) v primerjavi s študijo 46-ih sort, kjer so odkrili le 26 mikrosatelitov.

Trideset objavljenih mikrosatelitskih lokusov serije UDO (Cipriani *et al.*, 2002) je imelo v povprečju le po 3 mikrosatelite na lokus. Vzrok za tako nizko število ugotovljenih alelov je verjetno v ožji genetski podobnosti 12-ih sort, ki so jih avtorji vključili v analizo. La Mantia *et al.* (2005), ki so uporabili 6 UDO lokusov v študiji genetske strukture 46-ih akcesij oljk, so v povprečju namnožili bistveno več mikrosatelitov (7,8). Slabše parametre variabilnosti so odkrili na lokusu UDO-009, opažena heterozigotnost pa je bila nižja od pričakovane na lokusih UDO-008 in UDO-039, zato ti lokusi niso najbolj primerni za genetske študije.

Sodeč po številu namnoženih alelov na lokusih serije GAPI (Carriero *et al.*, 2002) bi lahko med 20 objavljenimi lokusi izbrali kot primerne za genetske študije lokuse: GAPI101, GAPI103A, GAPI47, GAPI89, GAPI71B, GAPI71A, GAPI45 in GAPI59. La Mantia *et al.* (2005) so potrdili visoko informacijsko vrednost dveh lokusov: GAPI101 in GAPI59.

Dobri parametri variabilnosti so bili ugotovljeni tudi za serijo mikrosatelitskih lokusov EMO (De la Rosa *et al.*, 2002). Na vseh lokusih razen EMOL so odkrili več kot 6 alelov, za EMO30 je bil značilno večlokusno namnoževanje markerjev, pri EMO90 pa je bila opažena heterozigotnost nižja od pričakovane. Nekoliko slabša sposobnost ločevanja sort je bila ugotovljena pri lokusih EMO13 in EMO88. Med informativne lokuse bi torej lahko uvrstili lokusa EMO2 in EMO3.

MICROSATELLITE MARKERS AND THEIR USE IN OLIVE GROWING

Dunja BANDELJ MAVSAR

University of Primorska, Science and Research Centre Koper, SI-6000 Koper, Garibaldijeva 1

E-mail: dunja.bandelj@zrs-kp.si

SUMMARY

Microsatellites as one of the most popular marker systems are widely used in plant genetic research for diversity studies, linkage analysis, genetic map development and fingerprinting studies. Their wide usage is based on their excellent properties, such as high abundance in eucaryotic genomes, co-dominant nature, hypervariability, robustness and high information content. In olives, first microsatellites were published in 2000, and from then on they have been frequently included in different olive genetic investigations. The objective of this work was to present published microsatellites in olives, to review their characteristics and to survey their applicability in olive genetic studies.

Key words: microsatellites, SSR, *Olea europaea* L., olive growing, polymorphism

LITERATURA

- Armour, J. A. L., S. A. Alegre, S. Miles, L. J. Williams & R. M. Badge (1999):** Minisatellites and mutation processes in tandemly repetitive DNA. In: Goldstein, D. B. & C. Schlötterer (eds.): *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, p. 24–33.
- Baali-Cherif, D. & G. Besnard (2005):** High genetic diversity and clonal growth in relict populations of *Olea europaea* subsp. *laperrinei* (Oleaceae) from Hoggar, Algeria. *Ann. Bot.*, 96(5), 823–830.
- Bandelj, D., J. Jakše & B. Javornik (2002a):** Genetske raziskave oljke. *Annales, Ser. Hist. Nat.*, 12(2), 239–248.
- Bandelj, D., J. Jakše & B. Javornik (2002b):** DNA Fingerprinting of Olive Varieties by Microsatellite Markers. *Food Technol. Biotechnol.*, 40(3), 185–190.
- Bandelj, D., J. Jakše & B. Javornik (2004a):** Amplification of fluorescent-labelled microsatellite markers in olives by a novel, economic method. *Acta agric. Slov.*, 83(2), 323–329.
- Bandelj, D., J. Jakše & B. Javornik (2004b):** Assessment of genetic variability of olive varieties by microsatellite and AFLP markers. *Euphytica*, 136, 93–102.
- Barranco, D., I. Trujillo & P. Rallo (2000):** Are 'Oblonga' and 'Frantoio' olives the same cultivar? *Hort-Science*, 35, 1323–1325.
- Belaj, A., Z. Satović, G. Cipriani, L. Baldoni, R. Testolin, L. Rallo & I. Trujillo (2003):** Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and their effectiveness in establishing genetic relationship in olive. *Theor. Appl. Genet.*, 107, 736–744.
- Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick & R. W. Davis (1980):** Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, 32, 314–331.
- Bowers, J. E., G. S. Dangl, R. Vignani & C. P. Meredith (1996):** Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome*, 39, 628–633.
- Breton, C., D. Claux, I. Metton, G. Skorski & A. Berville (2004):** Comparative study of methods for DNA preparation from olive oil samples to identify cultivar SSR alleles in commercial oil samples: possible forensic applications. *J. Agric. Food Chem.*, 52(3), 531–537.
- Busconi, M., C. Foroni, M. Corradi, C. Bongiorno, F. Cattapan & C. Fogher (2003):** DNA extraction from olive oil and its use in the identification of the production cultivar. *Food Chem.*, 83, 127–134.
- Carriero, F., G. Fontanazza, F. Cellini & G. Giorio (2002):** Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 104, 301–307.
- Chambers, G. K. & E. S. MacAvoy (2000):** Microsatellites: consensus and controversy. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 126, 455–576.
- Cipriani, G., M. T. Marrazzo, R. Marconi, A. Cimato & R. Testolin (2002):** Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and revealing polymorphism with ancient cultivars. *Theor. Appl. Genet.*, 104, 223–228.
- De la Rosa, R., A. Angiolillo, C. Guerrero, M. Pellegrini, L. Rallo, G. Besnard, A. Bervillé, A. Martin & L. Baldoni (2003):** A first linkage map of olive (*Olea europaea* L.) cultivars using RAPD, AFLP, RFLP and SSR markers. *Theor. Appl. Genet.*, 106(7), 1273–1282.
- De la Rosa, R., C. M. James & K. R. Tobutt (2002):** Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in olive (*Olea europaea* L.) and their transferability to other genera in the Oleaceae. *Mol. Ecol. Notes*, 2, 265–267.

- De la Rosa, R., C. M. James & R. Tobutt (2004):** Using microsatellites for paternity testing in olive progenies. *HortScience*, 39(2), 351–354.
- Eisen, J. A. (1999):** Mechanistic basis for microsatellite instability. In: Goldstein, D. B. & C. Schlötterer (eds.): *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, p. 34–48.
- Green, P. S. & G. E. Wickens (1989):** The *Olea europaea* complex. In: Tan, K. (ed.): *The Davis & Hedge Festschrift*. Edinburgh University Press, p. 287–299.
- Gupta, P. K. & R. K. Varshney (2000):** The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica*, 113, 163–185.
- Hancock, J. M. (1999):** Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: Goldstein, D. B. & C. Schlötterer (eds.): *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, p. 1–9.
- Huang, W. G., G. Cipriani, M. Morgante & R. Testolin (1998):** Microsatellite DNA in *Actinidia chinensis*: isolation, characterisation, and homology in related species. *Theor. Appl. Genet.*, 97, 1269–1278.
- Hugues, C. (1999):** Maslinarstvo Istre/Elaiografia Istriana. Ceres, Zagreb, 284 str.
- Jakše, J. & B. Javornik (2001):** High Throughput Isolation of Microsatellites in Hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Mol. Biol. Reporter*, 19, 217–226.
- Jones, C. J., K. J. Edwards, S. Castaglione, M. O. Winfield, F. Sala, C. van de Wiel, G. Bredemeijer, B. Vosman, M. Matthes, A. Daly, R. Brettschneider, P. Bettini, M. Buiatti, E. Maestri, A. Malcevski, N. Marmioli, R. Aert, G. Volckaert, J. Rueda, R. Linacero, A. Vazquez & A. Karp (1997):** Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol. Breeding*, 3, 381–390.
- Kashi, Y. & M. Soller (1999):** Functional roles of microsatellites and minisatellites. In: Goldstein, D. B. & C. Schlötterer (eds.): *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, p. 10–23.
- Kline, M. C., D. L. Duewer, P. Newall, J. W. Redman, D. J. Reeder & M. Richard (1997):** Interlaboratory evaluation of short tandem repeat triplex CTT. *J. Forensic Sci.*, 42, 897–906.
- Kozjak, P., Z. Korošec-Koruza & B. Javornik (2003a):** Characterisation of cv. refošk (*Vitis vinifera* L.) by SSR markers. *Vitis*, 42(2), 83–86.
- Kozjak, P., Z. Korošec-Koruza & B. Javornik (2003b):** Microsatellite analysis by automated fluorescent detection using ALFexpress apparatuses: A case of grapevine analysis. *Zbornik Biotehniške Fakultete, Univerza v Ljubljani. Kmetijstvo*, 81(1), str. 47–55.
- La Mantia, M., O. Lain, T. Caruso & R. Testolin (2005):** SSR-based DNA fingerprints reveal the genetic diversity of Sicilian olive (*Olea europaea* L.) germplasm. *J. Horticultural Sci. Biotechnol.*, 80(5), 628–632.
- Levinson, G. & G. A. Gutman (1987):** Slipped-strand misspairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.*, 4, 203–221.
- Litt, M. & J. A. Luly (1989):** A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 44, 397–401.
- Lopes, M. S., D. Mendonça, K. M. Sefc, F. S. Gil & A. Câmara Machado (2004):** Genetic evidence of intracultivar variability within Iberian olive cultivars. *HortScience*, 39(7), 1562–1565.
- McCouch, S. R., L. Teytelman, Y. Xu, K. B. Lobos, K. Clare, M. Walton, B. Fu, R. Maghirang, Z. Li, Y. Xing, Q. Zhang, I. Kono, M. Yano, R. Fjellstrom, G. DeClerck, D. Schneider, S. Cartinhour, D. Ware & L. Stein (2002):** Development and Mapping of 2240 New SSR Markers for Rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res.*, 9, 199–207.
- Metzgar, D., J. Bytof & C. Wills (2000):** Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. *Genome Res.*, 10, 72–80.
- Montemurro, C., R. Simeone, A. Pasqualone, E. Ferrar & A. Blanco (2005):** Genetic relationships and cultivar identification among 112 olive accessions using AFLP and SSR markers. *J. Horticultural Sci. Biotechnol.*, 80(1), 105–110.
- Morgante, M., M. Hanafey & W. Powell (2002):** Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nat. Genet.*, 30, 194–200.
- Morgante, M. & A. M. Olivieri (1993):** PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.*, 3, 175–182.
- Murray, V., C. Monchawin & P. England (1993):** The determination of the sequence present in the shadow bands of an dinucleotide repeat PCR. *Nucleic Acids Res.*, 21(10), 2395–2398.
- Muzzalupo, I. & E. Perri (2002):** Recovery and characterisation of DNA from virgin olive oil. *Eur. Food Res. Technol.*, 214, 528–531.
- Muzzalupo, I., N. Lombardo, A. Musacchio, M. E. Noce, G. Pellegrino, E. Perri & A. Sajjad (2006):** DNA Sequence Analysis of Microsatellite Markers Enhances Their Efficiency for Germplasm Management in an Italian Olive Collection. *Am. Soc. Horticultural Sci.*, 131(3), 352–359.
- Pafundo, S., C. Agrimonti & N. Marmioli (2005):** Traceability of Plant Contribution in Olive Oil by Amplified Fragment Length Polymorphisms. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 6995–7002.
- Pasqualone, A., C. Montemurro, F. Caponio & A. Blanco (2004):** Identification of virgin olive oil from different cultivars by analysis of DNA microsatellites. *J. Agric. Food Chem.*, 52(5), 1068–1071.
- Peakall, R., S. Gilmore, W. Keys, M. Morgante & A. Rafalski (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. *Mol. Biol. Evol.*, 15, 1275–1287.
- Powell, W., G. C. Machray & J. Provan (1996a):** Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci.*, 1, 215–222.
- Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey & A. Rafalski (1996b):** The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breeding*, 2, 225–238.
- Rafalski, J. A. & V. Tingey (1993):** Genetic diagnosis in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends Genet.*, 9, 275–280.
- Rallo, P., G. Dorado & A. Martín (2000):** Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 101, 984–989.
- Rallo, P., I. Tenzer, C. Gessler, L. Baldoni, G. Dorado & A. Martín (2003):** Transferability of olive microsatellite loci across the genus *Olea*. *Theor. Appl. Genet.*, 107, 940–946.
- Rugini, E. & L. Baldoni (2005):** *Olea europaea* Olive. In: Litz, R. E. (ed.): *Biotechnology of Fruit and Nut Crops*. CABI Publishing, Oxfordshire, p. 404–428.
- Schlötterer, C. (1998):** Microsatellites. In: Hoelzel, A. R. (ed.): *Molecular Genetics Analysis of Populations: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, p. 237–261.
- Schlötterer, C. (2000):** Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109, 365–371.
- Schuelke, M. (2000):** An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. *Nat. Biotechnol.*, 18, 233–234.
- Scott, I. A. W., C. M. Hayes, S. Keogh, J. K. Webb (2001):** Isolation and characterization of novel microsatellite markers from the Australian tiger snakes (Elapidae: *Notechis*) and amplification in the closely related genus *Hoplocephalus*. *Mol. Ecol. Notes*, 1, 117–119.
- Sefc, K. M., M. S. Lopes, D. Mendonça, M. Rodrigues Dos Santos, M. Laimer Da Câmara Machado & A. Da Câmara Machado (2000):** Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea* L.) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. *Mol. Ecol.*, 9, 1171–1173.
- Song, Q. J., E. W. Fickus & P. B. Cregan (2002):** Characterization of trinucleotide SSR motifs in wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 104, 286–293.
- Squirrell, J., P. M. Hollingsworth, M. Woodhead, J. Russell, A. J. Lowe, M. Gibby & W. Powell (2003):** How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants. *Mol. Ecol.*, 12, 1339–1348.
- Štajner, N., J. Jakše, P. Kozjak & B. Javornik (2005):** The isolation and characterization of microsatellites in hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Sci.*, 168, 213–221.
- Tautz, D., M. Trick & G. A. Dover (1986):** Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature*, 322, 652–656.
- Testolin, R. & O. Lain (2005):** DNA Extraction from Olive Oil and PCR Amplification of Microsatellite Markers. *J. Food Sci.*, 70(C108): doi:10.1111/j.1365–2621.2005.tb09011.x.
- Tóth, G., Z. Gáspári & J. Jurka (2000):** Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res.*, 10, 967–981.
- Vergas, P., F. Munoz Garmendia, J. Hess & J. Kadereit (2001):** *Olea europaea* subsp. *guanchica* and subsp. *maroccana* (Oleaceae), two new names for olive varieties. *Anal. Jardin Bot. Madrid*, 58, 360–361.
- Wattier, R., C. R. Engel, P. Saumitou-Laprade & M. Valero (1998):** Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Mol. Ecol.*, 7, 1569–1573.
- Weber, J. L. (1990):** Informativeness of human (dC-dA)_n·(dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics*, 7, 524–530.
- Weber, J. L. & P. E. May (1989):** Abundant class of human DNA polymorphisms can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.*, 44, 388–396.
- Weising, K., P. Winter, B. Hüttl & G. Kahl (1998):** Microsatellites markers for molecular breeding. *J. Crop Prod.*, 1, 113–143.
- Woolfe, M. & S. Primrose (2004):** Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trend Biotechnol.*, 22(5), 222–226.
- Wu, S.-B., G. Collins & M. Sedgley (2004):** A molecular linkage map of olive (*Olea europaea* L.) based on RAPD, microsatellite, and SCAR markers. *Genome*, 47(1), 26–35.
- Zohary, D. & P. Spiegel-Roy (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.