

review
received: 2002-11-15

UDC 634.63:631.52(497.4-14)

GENETSKE RAZISKAVE OLJKE

Dunja BANDELJ MAVSAR

Inštitut za sredozemsko kmetijstvo in oljkarstvo ZRS Koper, SI-6000 Koper, Garibaldijska 18

E-mail: Dunja.Bandelj@zrs-kp.si

Jernej JAKŠE & Branka JAVORNIK

Center za rastlinsko biotehnologijo in žlahtnjenje, Oddelek za agronomijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani,
SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

IZVLEČEK

Oljka (*Olea europaea* L.) že tisočletja uspeva v Sredozemskem bazenu, kjer je ena pomembnejših gojenih sadnih vrst. K vse večjemu povpraševanju in porabi oljčnega olja prispeva spoznanje, da je oljčno olje vir zdravih maščob v primerjavi z drugimi rastlinskimi maščobami, posledično pa narašča potreba po vzgoji in žlahtnjenju novih, sodobnih sort. V tem pogledu je vrednotenje obstoječih genskih virov oljke zelo pomembno, saj so le ti vir lastnosti, ki jih lahko izkoristimo v programih izboljšanja genetskega materiala oljke. V primerjavi z drugimi hortikulturnimi rastlinami, kjer je bil narejen velik napredek v vzgoji novih sort z uporabo molekulske genetskega znanja, so raziskave te vrste pri oljki razmeroma skromne. V zadnjem času je zaslediti pomembne premike na tem področju. Namen prispevka je prikazati trenutno stanje genetskih preučevanj oljke po svetu, vključno z domačimi raziskavami.

Ključne besede: oljka, *Olea europaea*, molekulske markerji, genetska raznolikost

STUDI GENETICI SUGLI OLIVI

SINTESI

Da millenni l'olivo (*Olea europaea* L.) prospera nel bacino Mediterraneo, dove viene considerato uno degli alberi da frutta coltivati più importanti. Il sempre maggiore richiesta e consumo dell'olio d'oliva sono dovuti alla conoscenza del fatto che tale olio contiene grassi benefici, a differenza di altri grassi vegetali. Di conseguenza cresce anche il bisogno di coltivare e nobilitare nuove sorte contemporanee. In questo contesto risulta molto importante la valorizzazione delle fonti genetiche esistenti, in quanto uniche fonti di caratteristiche che possono venir adoperate nei programmi di miglioramento del materiale genetico dell'olivo. In confronto ad altre piante orticulturali, per le quali è stato raggiunto un notevole progresso nella coltivazione di nuovi cultivar con l'aiuto della conoscenza genetica e molecolare, tali ricerche sono relativamente modeste per quanto riguarda l'olivo. Negli ultimi tempi si sono però registrati importanti passi avanti in questo campo e scopo dell'articolo è quello di illustrare la presente situazione nel campo della ricerca genetica dell'olivo nel mondo e nel campo di ricerca sloveno.

Parole chiave: olivo, *Olea europaea*, marcatori molecolari, diversità genetica

UVOD

Glede na spoznanje, da je oskrba tradicionalnih nasadov ekonomsko neutemeljena, se pridelovalci že od sredine prejšnjega stoletja ukvarjajo z vprašanjem, kako povečati rodnost oljčnih nasadov in znižati stroške pridelovanja oljk. Vpeljava novih gojitvenih oblik v oljčnike je med prvimi ukrepi, ki so bistveno povečali hektarske pridelke oljk. Manjše sadilne razdalje so vplivale na povečanje gostote dreves na hektar in posledično tudi višino pridelka. Izboljšana prehrana dreves z makro- in mikrohranili je pripomogla k rednejši in boljši rodnosti. Z namakanjem oljk so se pridelki povečali za 40 do 70%. Izbira ustreznih sort, prilagojenih intenzivni pridelavi, pa ostaja med pomembnejšimi dejavniki, ki vplivajo ne samo na višino pridelka, temveč tudi na njegovo kakovost.

Poraba oljčnega olja iz leta v leto narašča, potrošniki so glede kakovosti vse bolj zahtevni, zato je večina raziskav usmerjena ravno v preučevanje lastnosti oljčnega olja. Dosedanje raziskave so pokazale, da so sortno značilne kemične in organoleptične lastnosti tiste, ki s tehniko predelave plodov vplivajo na končno kakovost oljčnega olja. V procesih izboljšanja rastlinskega materiala oljke so največja ovira pomanjkljivi in nezadovoljivi podatki vrednotenja sort ali natančneje agronomskih lastnosti sort in sortne značilnosti oljčnega olja. To je tudi najpomembnejši razlog, zakaj je sistematična preučitev obstoječih genskih virov oljke potrebna. Velika genetska raznolikost oljke se kaže v množici najrazličnejših sort, klonov in divjih populacij, med katerimi lahko odberemo genotipe z najprimernejšo kombinacijo genov za intenzivno gojenje. Z namenom preučevanja genetske raznolikosti oljke ter odkrivanja najprimernejših genotipov, ki bodo poleg dobre prilagojenosti tehnologijam intenzivnega oljkarstva zagotovili še kakovosten pridelek, so v različnih državah ustanovili kolekcijske nasade, v katerih so zbrane sorte z določene območja. Primerjalna študija med standardnimi in prinešenimi sortami v kolekciji je najhitrejša in najprimernejša pot pri iskanju alternativ za nezadovoljivo sortno strukturo nekega pridelovalnega območja. V kolekcijskih nasadih poteka sistematično vrednotenje agronomsko zanimivih lastnosti in lastnosti oljčnega olja posameznih sort. Na osnovi večletnih opazovanj se ocenjuje genetski potencial dreves in izvednoti vpliv okolja na določene lastnosti, kar je nujno pred začetkom uresničevanja programov izboljšanja rastlinskega materiala. Agronomske lastnosti, ki se vrednotijo v kolekcijah, so dolžina mladostnega obdobja, rodnost, bujnost dreves, čas cvetenja, odpornost na bolezni in škodljivce ter tolerantnost na stresne dejavnike, kot so suša, nizke temperature, slana tla, itd. Vsebnost olja v plodovih (oljevitost sorte) je skupaj z rodnostjo pomembnejši parameter ocene neke sorte. Teža plodu je precej odvisna od okolja, medtem ko je vsebnost olja, izražena v suhi

snovi, zelo odvisna od posameznega genotipa oz. sorte. Kakovost olja posameznih sort v kolekcijah določajo z analitskimi in senzoričnimi analizami, ki v splošnem vključujejo sestavo in razmerje maščobnih kislin ter parametre stabilnosti olja. Pri tem se ocenjuje tako komercialna kot hranilna vrednost olja. O razlikah v sestavi maščobnih kislin med sortami poročajo številni avtorji. Minorne sestavine dajejo olju posebno vrednost, med njimi so najpomembnejši antioksidanti (biofenoli in tokoferoli). Razlike v sestavi teh komponent v oljih so posledica različnih ekstrakcijskih postopkov in vpliva sorte. Pri preučevanju minornih sestavin bi bilo treba določiti, v kolikšni meri na njihov nastanek vplivata genotip in okolje.

Kljub temu da je oljka genetsko bogata, oljkarji še nimajo na voljo sort, ki bi popolnoma ustrezale vsem zahtevam intenzivnega oljkarstva. Vzrok so skromnejši programi izboljšanja genetskega materiala oljke v preteklosti. Selekcija sort in klonska selekcija sta bili glavni dejavnosti, ki sta pripeljali do izboljšanja lastnosti obstoječih sort. Do sedaj je bilo v načrtovanih programih izboljšanja vzgojenih le nekaj sort. V Izraelu so z masovno selekcijo vzgojili sorti 'barnea' in 'kadesh', v Italiji so nove izboljšane sorte v fazi preizkušanja, v Španiji pa v programih izboljšanja ni bila vzgojena še nobena nova sorta (Rallo, 1999). Cilj klonske selekcije je med večjim številom osebkov neke sorte izbrati genetsko in zdravstveno najboljše. Klonska selekcija oljk se opravlja v različnih državah, o komercialni vrednosti klonov poročajo le v nekaj primerih. Tako so v Italiji zaščitili dva klona (FS-17 in DA-12) (Fontanazza, 1996). V Španiji so odbrali 52 klonov sorte 'manzanilla di Sevilla' in 15 klonov sorte 'arbecuina', ki so v fazi primerjalnih analiz s standardi. Tudi v Turčiji poročajo o prvih rezultatih klonske selekcije avtohtonih sort, katerih kloni imajo boljše lastnosti v primerjavi s standardi (Fiorino & Rallo, 1999). Z genetskega stališča se slabost klonske selekcije kaže predvsem v zmanjševanju genetske raznolikosti, saj je gojenje omejeno le na določene genotipe.

Med pomembne strategije izboljšanja genetskega materiala oljke uvrščamo tudi križanja, katerih cilj je izboljšati kakovost plodov (povečanje oljevitosti, izboljšanje karakteristik plodov) in prilagojenost rastlin na intenzivne pridelovalne okoliščine ter stresne razmere. V Italiji so leta 1971 križali 17 različnih sort oljk, ki se uporabljajo za vlaganje in olje. Rezultati dolgoletnih opazovanj agronomskih lastnosti potomcev so pokazali, da lahko pri oljki s križanji vzgojimo nove, tržno zanimive sorte. Na Kitajskem so sistematična križanja sort oljk pričeli leta 1980 z namenom vzgoje novih sort, ki bodo bolj prilagojene na klimatske in talne razmere (Fontanazza, 1996). Z načrtovanimi križanji lahko izboljšamo splošne lastnosti sort, vnesemo pa tudi neželene gene, ki jih moramo s številnimi povratnimi križanji odstraniti. Majhen in počasnejši napredek pri vzgoji novih sort oljk s križanji v primerjavi z drugimi

rastlinskimi vrstami je zagotovo posledica izredno dolgega mladostnega obdobja oljke. Rezultati dosedanjih križanj oljk sicer odpirajo nove poti in možnosti k ustvarjanju tržno zanimivih sort, vendar pa so informacije o dedovanju pomembnih lastnosti še vedno omejene, saj so preučene le na nivoju fenotipa. Specifičnih raziskav glede povezave med genotipom in fenotipskimi lastnostmi ni na voljo, posledica tega pa so pomanjkljivi selekcijski kriteriji.

Pregled, ali t.i. inventarizacija obstoječih genskih virov oljke torej sodi med prioritete dejavnosti intenzivnega oljkarstva, nam omogoča vpogled v genski bazen udomačene oljke in njene divje sorodnike, ki so lahko nosilci zanimivih in nadvse koristnih agronomskih lastnosti, kot so odpornost za bolezni, škodljivce in stres. Vse te lastnosti lahko uporabimo v programih izboljšanja genetskega materiala oljke pri ustvarjanju novih sort.

Razvoj molekularskih metod je omogočil alternativne pristope v številnih genetskih raziskavah. Vsestranska uporabnost molekularskih markerjev omogoča hitreje reševanje problemov, ki se pojavljajo pri zlahtnjenju rastlin, identifikaciji sort in klonov, ugotavljanju sorodstvenih odnosov med osebki, vrednotenju genetskega materiala in iskanju polimorfizma itd. Pri vzgoji novih sort s križanji lahko s pomočjo molekularskih markerjev identificiramo potomce z zelenimi lastnostmi, saj je selekcijo sejancev mogoče opraviti že v mladostnem obdobju rastline, kar bistveno skrajša čas zlahtnjenja. Markerji so namreč v nekaterih primerih tesno vezani na gene, ki kontrolirajo agronomsko zanimive lastnosti, zato jih lahko uporabljamo za sledenje lastnosti po križanju. Pomembno mesto med genetskimi raziskavami z molekularskimi markerji imajo preučevanja genetske raznolikosti oljke in študije sortne strukture območij, kjer se uveljavlja zaščita geografskega porekla oljčnega olja. Sorodstveni odnosi med sortami omogočajo rešiti tudi nekatere domneve, kot je npr. avtohtonost sort. Poznavanje genetske variabilnosti oljke na nekem območju nam lahko zagotovi koristne informacije o selekciji, nastanku sort in geografskem izvoru. V zadnjem času je bilo veliko raziskav namenjenih tudi rekonstrukciji zgodovine udomačitve, izvoru in širjenju oljke.

Metode molekularske biologije so prispevale nekatere novosti tudi v diagostiki, pri ugotavljanju okuženosti rastlinskega materiala z virusi. Spremljanje zdravstvenega stanja sadik je pomembno pri vzgoji certificiranega materiala. Poleg klasičnih imunoloških testov ELISA za ugotavljanje virusov v rastlinah so na voljo tudi postopki, ki temeljijo na uporabi polimerazne verižne reakcije (PCR). Metode PCR omogočajo hitro in zanesljivo identifikacijo virusa. Molekularske metode za odkrivanje virusov oljke se že uporabljajo v Španiji in na Portugalskem (Rallo, 1999). Med pomembnejše raziskave sodijo tudi poskusi vzgoje oljk s tkivnimi kulturami. Mikropropagacija (razmnoževanje) *in vitro* je bistveno skraj-

šala čas razmnoževanja, ki je neodvisen od letnega časa, poleg tega pa omogoča vzgojo večjega števila rastlin na majhnem prostoru. Preliminarne rezultate vzgoje in razmnoževanja oljke *in vitro* so predstavili v Italiji (Standardi *et al.*, 1998; Leva *et al.*, 2000). Vzgoja odpornih sort na bolezni in škodljivce ter stresne razmere sodi med najpomembnejše cilje sodobnega kmetijstva. Razvoj genskega inženirstva je omogočil vnašanje genov v genom rastline z natančnim zapisom za določeno lastnost. S postopkom neposrednega vnašanja zelenih genov premostimo težave, kakršna je npr. nekompatibilnost pri križanju dveh genetsko oddaljenih vrst, izognemo se vnosu neželenih lastnosti, itd. O prvem poskusu genetske transformacije oljke poročajo v Italiji (Mencuccini *et al.*, 1998). Rezultati so spodbudni in perspektivni. Oljko namreč pridelovalci želijo gojiti v širšem arealu, zato je treba vzgojiti sorte, ki bodo dobro prenašale sušo, težka tla in nizke temperature. Raziskave bodo v prihodnosti usmerjene v iskanje in identifikacijo genov za odpornost na biotski in abiotski stres. Zanimivi so tudi geni, ki so povezani s kakovostjo pridelka.

MOLEKULARSKI MARKERJI V GENETSKIH ŠTUDIJAH

Rastline imajo tri avtonomne genome. V jedru celice je jedrna DNA, celična organela (plastida), kloroplast in mitohondrij, ki sta v celični citoplazmi, pa vsebujeta kloroplastno DNA (cpDNA) oz. mitohondrijsko DNA (mtDNA). Za plastidni DNA je značilno nemendlovsko ali citoplazmatsko dedovanje, kar pomeni, da se od jedrne DNA neodvisno dedujeta, večinoma po materi. Variabilnost v molekularskih markerjih in sekvencah nekaterih genov kloroplastnega genoma se uporablja za karakterizacijo rastlinskih populacij ali divjih sorodnikov (Javornik, 1996). Raznolikost mitohondrijskega genoma pri rastlinah je zanimiva za ugotavljanje pretoka genov in strukture populacije. Rastline z enako mtDNA imajo skupnega ženskega prednika, saj se pri dedovanju materina mtDNA prenese na vse potomce, zato lahko sledimo maternalnem rodovniku. Ker se ne rekombinira, se mutacije v njej akumulirajo hitreje, tako da je mtDNA bolj polimorfna v primerjavi z jedrno DNA.

Prvi markerji, ki so se uporabljali za vrednotenje raznolikosti pri rastlinah, so bili fenotipski (morfološki). Uporaba le-teh je bila povezana s številnimi metodološkimi težavami, kot so zamudno delo, omejeno število razpoložljivih markerjev, odvisnost markerjev od razvojne stopnje rastline in okolja ter subjektivni pristop pri vrednotenju. Razvoj in uporaba izoenzimskih markerjev sta genetsko analizo vodila na molekularski nivo, vendar je bila zaradi majhne številčnosti njihova uporaba omejena. Razvoj molekularskih markerjev je omogočil revolucionaren pristop preučevanja genomov. Marker je lahko katerokoli zaporedje DNA, ki ga lahko brez večjih težav odkrijemo in spremljamo njegovo dedovanje. Danes imamo kar nekaj molekularskih markerjev, ki se

razlikujejo v svojih lastnostih, informativnosti, ceni razvoja markerskega sistema in zahtevnosti tehnike. Glede na namen preučevanja organizma lahko izbiramo med hibridizacijskimi (RFLP markerji) in PCR (RAPD, AFLP markerji, mikrosateliti) tehnikami.

Prvi razviti markerski sistem, ki je omogočil odkrivanje polimorfizma na nivoju DNA, so markerji RFLP (polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov). Tehnologija RFLP temelji na razrezu genomske DNA z restrikcijskimi encimi, razrezani DNA fragmenti se nato elektroforetsko ločijo in prenesejo na membrano, sledi odkrivanje specifičnih fragmentov DNA s hibridizacijo z radioaktivno označeno sondo. Razlike med preučevanimi organizmi opazujemo kot spremenjene vzorce DNA restrikcijskih fragmentov. Pri študijah genetske raznolikosti organizmov se prednost tega markerskega sistema kaže v tem, da so rezultati dobro ponovljivi med različnimi laboratoriji, med slabosti pa lahko uvrstimo tehnično zahtevnost metode. Markerje RFLP so raziskovalci v oljkarstvu uporabili predvsem v študijah genetske raznolikosti kloroplastne in mitohondrijske DNA z namenom rekonstrukcije širjenja oljk v Sredozemlju, ugotavljanju izvora in sorodnosti divjih in kultiviranih oljk.

V zadnjih nekaj letih so bili markerji RAPD najpogosteje uporabljeni molekularni markerji za preučevanje genoma oljke. Naključno namnoženo polimorfno DNA (RAPD) so raziskovalci uporabili v obsežnih študijah genetske sorodnosti oljk glede na geografski izvor in uporabo plodov (Fabbri et al., 1995; Claros et al., 2000; Belaj et al., 2001, 2002; Besnard et al., 2001; Sanz-Cortés et al., 2001) in identifikaciji sort (Vergari et al., 1998; Wiesman et al., 1998; Barranco et al., 2000; Bandelj et al., 2001). Markerji RAPD omogočajo odkrivanje in analizo polimorfizmov v celotnem genomu. Metoda temelji na namnoževanju neznanih predelov DNA. Razlike med analiziranimi osebki preučujemo s primerjavo DNA odtisa (profila) posameznega organizma. Velika prednost tehnike RAPD je v nizki razvojni ceni ter v njeni preprostosti, največji omejevalni dejavnik pa slaba ponovljivost rezultatov, kar preprečuje medlaboratorijsko primerjavo.

Markerji AFLP (dolžinski polimorfizem namnoženih fragmentov) ravno tako kot RAPD omogočajo odkrivanje polimorfizmov iz naključnih regij genoma. Ker pokrivajo večji del genoma, se pogosto uporabljajo v različnih genetskih raziskavah, kot so genotipiziranje DNA, identifikacija, kartiranje in preučevanje genetske sorodnosti (Vos et al., 1995; Maughan et al., 1996; Sharma et al., 1996; Cervera et al., 1998; Jakše et al., 2001). Informacije o uporabnosti markerjev AFLP v genetskih raziskavah oljke so omejene, saj je bila objavljena le študija Angiollilo et al. (1999), v kateri so preučevali genetsko raznolikost znotraj in med populacijami rodu *Olea*.

Prvi mikrosatelitni markerji oljke so bili znani v letu 2000 (Rallo et al., 2000; Sefc et al., 2000). Informacije o

karakterizaciji izoliranih mikrosatelitov oljke so za zdaj še precej omejene. Mikrosateliti združujejo lastnosti različnih markerjev, tako da jih v literaturi večkrat omenjajo kot idealen markerski sistem za genetske študije. Odlikujejo jih možnost odkrivanja visoke stopnje polimorfizma in s tem velika informativnost (Morgante & Olivieri, 1993; Powell et al., 1996).

PREGLAD GENETSKIH RAZISKAV OLJKE

Študije izvora in domestikacije oljke

Arheološke izkopanine dobro ohranjenih karboniziranih oljčnih koščic pričajo o izjemni starosti oljke. Ocenjujejo, da se je oljka skupaj z žiti, stročnicami in datljem pojavila v Palestini okrog 4000 let pred našim štetjem. V srednji in pozni bronasti dobi sta bila oljkarstvo in proizvodnja oljčnega olja dobro razvita na širšem območju Sredozemlja, od Palestine in Sirije do Grčije. Kasneje, v obdobju kolonizacije, so oljko z Bližnjega vzhoda zanesli še v druga sredozemska območja. Oljka pripada kompleksu *O. europaea* (Green & Wickens, 1989), ki je glede na morfološke karakteristike oljk sestavljen iz 6 podvrst. Vsaka podvrsta je značilna za določeno geografsko območje. *O. europaea* subsp. *europaea* je poznana kot sredozemska oljka, *O. e.* subsp. *maroccana* (Greut. & Burd.) je endemična na območju južnega Maroka, *O. e.* subsp. *laperrinei* (Batt. & Trab.) uspeva v Saharskem gorovju, *O. e.* subsp. *cerasiformis* (Webb & Berth.) je endemična na Madeira otoku, *O. e.* subsp. *guanchica* je poznana na Kanarskih otokih, *O. e.* subsp. *cuspidata* (Wall.) pa je razširjena v južni Afriki in na Kitajskem. Podvrsta *cuspidata* je sestavljena iz več morfološko različnih tipov, ki so omejeni z geografskim območjem: *Olea africana* Mill. (od južne do vzhodne Afrike), *O. chrysophylla* Lam. (od vzhodne Afrike do Arabije) in *O. cuspidata* Wall. (od Irana do Kitajske) (Besnard et al., 2002).

Domestikacija v današnje kultivirano sredozemsko oljko (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *europaea*) je potekala s selekcijo na večji plod in višjo vsebnost olja, spremenila je tudi reproduktivno biologijo drevesa. Kultivirane oljke se razmnožujejo nespolno (vegetativno) s kloni, tako da imajo fiksirane zelene lastnosti. Divje oljke (oleastri) [*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *sylvestris* (Mill.) Lehr] uvrščamo v dve skupini; divje oblike, ki uspevajo v primarnih nišah brez kultiviranja in sredozemskih gozdovih, ter podivjane tipe, ki so nastali s spontanim križanjem med oleastri in sortami v opuščeni nasadih (Zohary & Spiegel-Roy, 1975). Divjih (pravi oleastri) in podivjanih oblik (feral) na osnovi morfoloških znakov ni moč ločiti, ker so si fenotipsko izredno podobne, medtem ko so uspešno opravili identifikacijo oz. ločitev z molekularskimi markerji. Kultivirane, divje in podivjane oljke se lahko med seboj neovirano križajo. Križanja omogočajo vključitev genov

iz divjih oljk v kultivirane, kar se navsezadnje kaže v veliki genetski raznolikosti današnjih oljk. Kompleksno genetsko ozadje oljke je velik izziv za različne raziskovalne skupine, ki poskušajo pojasniti njihov nastanek, geografski izvor, genetsko sorodnost ter preučiti in rekonstruirati zgodovino udomačitve oljke.

Izvor in domestikacijo kultivirane oljke sta preučevala Besnard in Bervillé (2000). Z raziskavo sta želela ugotoviti, ali imajo kultivirane oljke in oleastri skupen izvor v sredozemskem bazenu, zato sta v analizo vključila oljke, razširjene v Aziji, Afriki in Evropi. Analizirala sta 121 sort, 300 oleastrov, 27 populacij iz sredozemskega bazena in 74 dreves različnih podvst iz Maroka (*O. maroccana*), Alžirije (*O. laperrinei*), Kanarskih otokov (*O. e. spp. cerasiformis*), Kenije, Južnoafriške republike, Zimbabveja (*O. africana*), Jemna (*O. chrysophylla*), Irana, Indije in Kitajske (*O. cuspidata*). Z molekularnimi markerji sta preučevala raznolikost jedrne, mitohondrijske in kloroplastne DNA. Na osnovi rezultatov citoplazmatskega DNA polimorfizma sta naredila rekonstrukcijo širitve sort ter podala distribucijo tipov citoplazme v lokalnih oleastrih. Oljke *O. africana*, *O. chrysophylla* in *O. cuspidata* imajo različno kloroplastno DNA. *O. maroccana* in *O. e. spp. cerasiformis* imata tip kloroplasta, ki ga najdemo v večini sort in oleastrov. Več polimorfizma so odkrili v mitohondrijski DNA v primerjavi s kloroplastno DNA. V kompleksu *O. europaea* sta odkrila 12 različnih tipov mitohondrijske DNA (v nadaljevanju mitotip), vendar od teh le 4 take, ki obstajajo v sredozemskih oljkah. Oleastri in sorte vsebujejo mitotip ME1, kar nakazuje, da so današnje sorte nastale z domestikacijo oleastrov na Bližnjem vzhodu. Na zahodu se pojavlja mitotip MCK, ki pripada rodu *Olea* iz terciarne dobe. Mitotip MOM so odkrili v oljkah iz Sahare in vzhodne Afrike, ME2 pa samo v določenih sortah. Raznolikost jedrne DNA oleastrov, odkrite z markerji RAPD, je pokazala ločitev med vzhodnimi in zahodnimi oljkami, pri sortah pa ni bilo jasne meje, po vsej verjetnosti zaradi prenašanja rastlinskega materiala iz kraja v kraj in regionalne selekcije sort. V zaključkih sta avtorja zapisala, da obstaja več območij izvora in da je izvor oljke bistveno kompleksnejši, kot so pričakovali.

Študije genetske variabilnosti divjih in kultiviranih oljk

Med prve raziskave genetske variabilnosti oljke sodi delo Loukasa in Krimbasa (1983), ki sta analizirala 25 sort s petnajstimi izoencimski sistemi. Na osnovi raznolikosti izoencimskih sistemov sta ugotovila, da je velikost plodov oljk pomembna pri ugotavljanju sorodnostnih odnosov med sortami. Večjo genetsko sorodnost je možno odkriti pri sortah, ki so bile selekcionirane za namizne oljke (veliki plodovi). Podobno genetsko sorodnost sta odkrila tudi v skupini sort s srednje velikimi plodovi, ki se uporabljajo za olje.

V letu 1999 je bila objavljena prva obsežnejša študija genetske variabilnosti znotraj in med populacijami rodu *Olea* z markerji AFLP. Angiolillo et al. (1999) so z raziskavo želeli odgovoriti predvsem na dve vprašanji: iz katerih divjih oljk so se razvile današnje kultivirane oljke in katere populacije lahko v prihodnosti dodatno izboljšajo kultivirano oljko. V analizo so vključili 43 sort, 30 divjih oljk in 9 oljk, ki po klasifikaciji Greena in Wickensa (1989) ne pripadajo vrsti *O. europaea*. Obseg polimorfizma je pokazal zelo jasno ločitev kultiviranih in divjih oljk v dve skupini. Avtorji so poskušali odkriti povezavo med večjo genetsko sorodnostjo sort glede na geografski izvor, vendar so med sortami večjo genetsko sorodnost odkrili le pri oljkah s Sicilije. Slednje ugotovitve potrjujejo kompleksnost domestikacije oljke. Kultivirane in divje oljke ter vrste iz severozahodne Afrike so genetsko sorodnejše v primerjavi z vrstami iz vzhodne Afrike in Azije. Največja variabilnost je bila odkrita pri vrstah z otokov Indijskega oceana in Avstralije. Avtorji so v nadaljevanju predvidevali, da sta kultivirana in divja oljka različni obliki iste vrste *O. europaea*, divji vrsti iz Maroka (*O. maroccana*) in iz Alžirije (*O. laperrinei*) pa sta verjetno vmesni obliki med *O. europaea* in azijskimi vrstami.

Amane et al. (1999) so z markerji RFLP preučevali polimorfizem kloroplastne DNA oljk iz sredozemskega bazena. Analizirali so 72 sort, 89 lokalnih, starih dreves in 101 oleastrov. Z analizo potomcev kontroliranega križanja so dokazali dedovanje kloroplastne DNA po materi. V celotni vrsti *europaea* so odkrili 5 različnih klorotipov. Klorotip I je bil najpogostejši v oleastrih in kultivirani oljki, drugi klorotipi (II, III in IV) pa so bili odkriti samo v oleastrih. Klorotip V so okarakterizirali s tremi mutacijami, ki jih najdemo v različnih predelih kloroplastne DNA (cpDNA), pojavil pa se je tako v kultiviranih kot divjih oljkah, vendar le v moško sterilnih drevesih s specifično anomalijo peloda. Predvidevajo, da je klorotip V povezan z večjo plodnostjo, ki je navadno opažena pri moško sterilnih drevesih.

V Maroku so Amane et al. (2000) preučili polimorfizem markerjev RFLP kloroplastne DNA kultiviranih in divjih oljk. Z raziskavo so želeli ugotoviti sorodstvene odnose med kultiviranimi in divjimi oljkami v Maroku in med vrsto *O. europaea* ter endemično vrsto *O. laperrinei* subsp. *maroccana*. Odkrili so 4 klorotipe: klorotip I je prevladoval v kultivirani (100%) in divji oljki (74%), kar kaže na tesno sorodstvo po materi, klorotipa II in III pa sta bila ugotovljena le v divjih maroških oljkah. Izvirnost taksona *O. maroccana* naj bi dokazoval klorotip IV, saj se je pojavil le pri tej vrsti.

Besnard et al. (2001) so zbrali 102 genotipa iz različnih območij Sredozemlja ter z analizo polimorfizma jedrne in mitohondrijske DNA preučili sorodstvene povezave sort. V raziskavi so uporabili markerje RAPD in RFLP. Na osnovi multivariatne analize so izdelali dendrogram, v katerem so bile sorte

razdeljene v 22 skupin, ki so se ujemale tako z regijo gojenja kot z uporabo oljk (olje/namizne oljke). Iz dobljenih rezultatov so predpostavljali, da je selekcija sort potekala v različnih regijah kot rezultat kolonizacije v času rimske dobe in prenašanja rastlinskega materiala z vzhoda na zahod. Podobno so sklepali tudi iz polimorfizma mitohondrijske DNA. Mitotipa MOM in MCK so odkrili samo v zahodnih sortah, ME1 mitotip pa v sortah iz Francije. Ker je ME1 mitotip značilen tudi za oleastre z vzhoda, menijo, da francoske sorte izhajajo prav z vzhoda. Njihovi rezultati potrjujejo tudi domnevo, da je selekcija v zahodem genskem bazenu potekala predvsem v smeri izboljšanja oljevitosti oljk.

Preučevanje polimorfizma jedrne in mitohondrijske DNA ostaja med najpogostejšimi raziskavami domestikacije oljke. Bronzini de Caraffa et al. (2002) so z molekuskimi markerji RAPD in RFLP preučili polimorfizem jedrne in mitohondrijske DNA kultiviranih in divjih oljk na Korziki in Sardiniji. Korzika in Sardinija sta zanimiv genski bazen oljk, saj v tem območju uspeva veliko sort in oleastrov. Oleastre je možno odkriti tudi v gozdovih. Sorte so bile večinoma prinesene iz Italije, nekaj pa jih je nastalo z lokalno selekcijo. V opuščeni nasadih uspevajo podivjane oljke, križanci oleastrov in sort. Podivjane oljke so sicer fenotipsko podobne oleastrom, večjo genetsko sorodnost pa kažejo s sortami. Z raziskavo so želeli preučiti tudi vpliv vzhoda (Italije) in zahoda pri nastanku korziških in sardinijskih oljk. V analizo so vključili 32 sort in 99 oleastrov. Polimorfizem mitohondrijske DNA je ravno tako kot pri zgoraj navedenih študijah pokazal obstoj 4 mitotipov; ME1, ME2, ki sta značilna za vzhodne oljke, MOM in MCK, karakteristična za oljke iz zahodnega Sredozemskega bazena. Večina sort s Korzike in Sardinije ima vzhodni mitotip, kar potrjuje difuzijo sort z vzhoda proti zahodu. Na Korziki so odkrili dve skupini sort. Ena je v tesni sorodnosti z oleastri, druga pa je povezana z italijanskimi in sardinijskimi sortami.

Raziskave genetske variabilnosti oljk potekajo tudi v Avstraliji. V južno Avstralijo so od leta 1836 prinesli na stotine sort oljk. Navzkrižno opraševanje dreves v 160 let starih in opuščeni nasadih se kaže v nastanku podivjanih populacij dreves, ki uspevajo v vseh regijah in so ekološki problem zaradi konkuriranja z naravno vegetacijo. Zaradi slednjega so ponekod lokalne oblasti oljčno drevo proglasile kot plevel in ga poskušale zatreti. Z namenom, da bi preučili dinamiko širjenja podivjanih vrst oljk, so Mekuria et al. (2002) z markerji RAPD analizirali populacijo 45 dreves iz južne Avstralije. Na osnovi vizualnih opazovanj so drevesa razdelili v tri skupine: sorte, domnevne potomce nekontroliranih križanj sort in podivjane oljke. Med seboj so primerjali profile RAPD posameznih dreves. Znotraj posamezne skupine oljk so odkrili velik polimorfizem, pri primerjavi polimorfizma med skupinami pa ni bilo večjih odstopanj.

Belaj et al. (2002) so z markerji RAPD preučevali genetsko raznolikost večje skupine sort (103) iz genske banke v Cordobi. Med glavne cilje raziskave so uvrstili: opisati raznolikost sort v svetovni genski banki oljke z markerji RAPD, izvednotiti sorodnost med sortami znotraj kolekcije, preučiti vzorec raznolikosti sort z različnim geografskim poreklom, uporabiti dobljene informacije v žlahtniteljskih programih ter podati strategijo vzorčenja v kolekcijah genskih virov oljke. Združevanje v sorodnostne skupine sort iz sosednjih geografskih območij nakazuje, da imajo le te skupno genetsko ozadje. Veliko genetsko sorodnost kažejo francoske sorte in sorte iz vzhodnega in osrednjega Sredozemlja, kar pomeni, da imajo skupen izvor.

Molekulska karakterizacija in identifikacija kultivarjev oljk

Vegetativno razmnoževanje oljke je v preteklosti omogočilo intenzivno izmenjavo rastlinskega materiala v državah Sredozemlja, kar pa je povzročilo nejasnosti glede imenovanja sort in klonov. Številne in zelo različne sorte so nastale kot rezultat naravne selekcije ter selekcije sort in klonov na regionalnem nivoju. Število sort oljke je danes ocenjeno na 2000, vendar je lahko zaradi pojavljanja homonimov in sinonimov precenjeno ali podcenjeno, kar pa povzroča večje težave pri vrednotenju genetskega materiala oljke. Mnoge sorte so bile opisane že v davni preteklosti, veliko pa je takih, ki so še vedno neklasificirane ali celo neznanne (Fontanazza, 1996). Na območjih, kjer je oljkarstvo tradicionalno in ni bilo večjih tehnoloških napredkov, lahko še danes najdemo ekotipe, ki so poznani le na lokalnem nivoju. Z namenom, da ohranijo genske vire oljke, so leta 1971 v Cordobi (Španija) ustanovili svetovno gensko banko oljke Olive World Germplasm Bank (OWGB). V genski banki je zbrano 328 sort iz različnih držav. Identifikacijska dela so pokazala, da je kar nekaj zbranih sort zastopanih večkrat, kar pa je posledica sinonimov (Caballero & del Rio, 1999). Zaradi boljšega kontroliranja rastlinskega materiala oljke v prometu in pravilne identifikacije sadik v drevesnicah moramo vzpostaviti sistem nedvoumne identifikacije sort in klonov, kar bo prispevalo tudi k hitrejšemu reševanju sinonimov in homonimov.

Prvi sistemi identifikacije oljk so temeljili na opisnih lastnostih rastline: vejice, socvetja, ploda, lista in endokarpa (Cifferri et al., 1942). Primarno identifikacijo so v sklopu mednarodnega projekta RESGEN-CT96/97, ki ga financirata EU in Mednarodni svet za oljčno olje, začeli opravljati v 10 državah z namenom ohranitve, karakterizacije in zbiranja genskih virov oljke (Caballero & del Rio, 1999). Kvantitativni in kvalitativni deskriptorji oljke (Gregoriou, 1996; Cantini et al., 1999; Levanič et al., 2000; Koprivnjak & Pribetić, 2000) pa niso rešili dejanskega problema identifikacije, saj so ti znaki v

veliki meri odvisni od vplivov okolja, ekspresije genov, specifičnosti analiziranega tkiva in razvojnega obdobja rastline. Podobno velja tudi za izoencimske markerje, s katerimi so poskušali ločiti različne sorte v Španiji (Trujillo et al., 1995) in Maroku (Ouazzani et al., 1996). Z razvojem molekularskih markerjev se je sistem identifikacije bistveno spremenil. Tradicionalno vrednotenje in identifikacijo na osnovi morfoloških markerjev bi bilo smiselno dopolniti z molekularskimi markerji, saj nam bodo le slednji dokončno omogočili rešiti probleme imenovanja sort.

Markerji RAPD so bili do sedaj najpogosteje uporabljeni pri razločevanju sort. V Španiji so Belaj et al. (2001) proučevali polimorfizem in sposobnost razločevanja sort oljk iz genske banke v Cordobi. Analizirali so 51 reprezentativnih sort. Avtorji poročajo o markerskem sistemu RAPD kot zelo uporabnem pri upravljanju genskih bank, saj omogoča natančno in hitro identifikacijo večjega števila sort. Na osnovi multivariatne analize so izdelali dendrogram, v katerem so bile sorte razvrščene v sorodnostne skupine glede na geografski izvor.

Za provinco Malaga (Andaluzija) v južni Španiji so značilna območja, ki se močno razlikujejo v pedoklimatskih razmerah. Claros et al. (2000) so predpostavljali, da je v tem območju genetska variabilnost oljk kot posledica adaptacij na okoljske razmere zelo velika. Zaradi izjemne ekonomske pomembnosti oljke v Andaluziji in zaradi nepoznavanja genetskega ozadja tamkajšnjih oljk so analizirali 56 sort iz različnih oljčnikov. Pri ugotavljanju genetske sorodnosti s pomočjo markerjev RAPD so odkrili 3 skupine, med katerimi je ena vključevala avtohtone andaluzijske oljke, kar nakazuje, da so le-te nastale v območju s selekcijo in imajo skupno genetsko ozadje.

V Argentini uspevajo številne sorte španskega in italijanskega izvora. Cavagnaro et al. (2001) so pričakovali, da obstaja možnost napačnih imenovanj sort, zato so preučili 10 najpogostejših sort v Argentini, ki jih hranijo v zbirki v Mendozii. V analizo RAPD so vključili tudi nekatere istoimenske sorte iz genske banke v Cordobi. Pri primerjavi profilov RAPD sedmih sort iz svetovne kolekcije in kolekcije iz Argentine so odkrili, da ima le sorta 'manzanilla de Carmona' enak profil RAPD, vse druge pa se v profilu RAPD razlikujejo ('farga', 'empeltre', 'frantoio', 'manzanilla espanola', 'arbequina', 'arauco'). Največ razlik v profilih RAPD so odkrili pri sortah 'frantoio' in 'farga'. Razlike v profilih RAPD istoimenskih sort so lahko posledica napačnega poimenovanja ali pa obstoja različnih klonov znotraj sort.

Zaradi negotovosti glede identifikacije ter opaženih fenotipskih razlik znotraj nekaterih lokalnih sort so Wiesman et al. (1998) v Izraelu z markerji RAPD ovrednotili tradicionalne in prinešene sorte. Ugotovili so, da so slednje genetsko homogene. Lokalna sorta 'souri' je prav tako homogena in dobro definirana sorta. Znotraj sorte 'nabali' so odkrili polimorfizem, kar je

verjetno posledica spontanih križanj različnih genotipov v preteklosti. Molekularska karakterizacija je raziskovalcem omogočila pojasniti, kako in kje se je lokalni material razmnoževal ter širil med pridelovalci v Izraelu.

V Franciji poteka revitalizacijski program oljkarstva, katerega namen je narediti podatkovno bazo petdesetih referenčnih genotipov oljk, ki bo v pomoč drevesničarjem pri identifikaciji in certifikaciji sadilnega materiala. Khadari et al. (2001) so z markerji RAPD opisali 32 sort. Da bi dobili res pravi referenčni profil sorte, so za vsako sorto analizirali najmanj 3 drevesa iz različnih lokacij. Pri 32 sortah so odkrili sortno specifičen profil RAPD, 2 do 3 različne profile RAPD na sorto pa so odkrili pri 9 sortah, zato so kot referenčni profil za identifikacijo avtorji izbrali tistega, ki je bil značilen za večino dreves analizirane sorte. Razlike v profilih RAPD znotraj sorte pripisujejo napačnemu poimenovanju in označevanju dreves. Pri analizi različnih klonov znotraj sort 'grossane' (13), 'caillietier' (6) in 'picholine' (8) z markerji RAPD niso odkrili razlik. Vsi kloni so imeli enak profil RAPD. Podatkovno bazo referenčnih genotipov oljk bodo v Franciji dopolnili še z mikrosatelitnimi markerji.

V Sloveniji se je v zadnjih štiridesetih letih sortna struktura precej spremenila, predvsem zaradi precejšnje starih lokalnih sort s sorto 'istrska belica' in sajenja sort, prinešenih iz Italije. Zaradi pomanjkljivih informacij o sortni strukturi območja slovenske Istre smo v letu 1999 pričeli z inventarizacijo sort s pomočjo mednarodnih deskriptorjev (Levanič et al., 2000). Morfološko karakterizacijo smo v nadaljevanju dopolnili z molekularsko. Polimorfizem 10 prinešenih in 5 lokalnih sort oljk, ki uspevajo v kolekcijskem nasadu, smo preučili z markerji RAPD (Bandelj et al., 2001). Glede na nivo odkritega polimorfizma lahko sklepamo, da imamo v Sloveniji veliko genetsko raznolikost sort, kar je pričakovati glede na število sort, prinešenih iz tujine. Razvili smo sistem identifikacije sort z markerji RAPD ter izdelali podatkovno bazo referenčnih sortnih profilov RAPD. Molekularska analiza dreves v kolekciji je potrdila identičnost genotipov znotraj trinajstih sort, pri dveh sortah pa smo odkrili napačno označitev dreves, do katere je po vsej verjetnosti prišlo v času dosajevanja. Markerji RAPD so uporabni pri upravljanju kolekcij, saj nam omogočajo preverjanje identitete sadik in s tem zmanjšanje napak pri postavitvi nasadov ali kolekcij.

Mikrosatelitni markerji in njihova uporaba v oljkarstvu

V letu 2000 sta dve raziskovalni skupini poročali o izolaciji prvih mikrosatelitnih markerjev oljke. Sefc et al. (2000) so objavili identifikacijo 15 mikrosatelitnih lokusov in predstavili njihovo karakterizacijo v izbranem setu oljk. Rallo et al. (2000) so izolirali 5 novih mikrosatelitnih markerjev oljke, preučili njihovo dedovanje na križancih družine 'leccino' in 'dolce agogia' ter jih uporabili v identifikacijske namene. Velika informa-

tivnost mikrosatelitnih markerjev je omogočila razločevanje med 42 sortami od 46 analiziranih. Cipriani et al. (2002) ter Carriero et al. (2002) so objavili najnovejša dela o postopkih izolacije mikrosatelitnih markerjev oljke. Med vsemi danes razpoložljivimi markerji mikrosateliti največ obetajo. Prednost tega markerskega sistema je v dobri ponovljivosti rezultatov znotraj in med laboratoriji ter možnosti izmenjave rezultatov med različnimi raziskovalnimi skupinami. Med slabosti uvrščamo visoko razvojno ceno tehnike ter dolgotrajen in zahteven postopek izolacije mikrosatelitov. V zadnjih dveh letih je razvoj mikrosatelitnih markerjev oljke že omogočil nekaj aplikativnih raziskav, ki jih bomo v nadaljevanju na kratko predstavili.

V okolici Gardskega jezera obstajajo 3 geografsko zaščitena porekla oljčnega olja: Garda Bresciano, Garda Orientale in Garda Trentino. Za vsako območje je natančno določeno, katero sorto lahko pridelovalci gojijo v oljčnikih in kolikšna količina določene sorte, izražena v odstotkih, sme biti zastopana v oljčnem olju. Zato je pomembno, da se sortna struktura preuči, preden se zakonsko določi, katera sorta sme biti v oljčnem olju določenega geografskega porekla in katera ne. Nekatera olja, ki so zaščitena z geografskim poreklom, smejo biti pridelana le iz avtohtonih ali lokalnih sort, medtem ko so lahko prinešene sorte v olju zastopane v zelo majhnem deležu. Sorta 'casaliva' naj bi bila lokalna in značilna za Gardo, vendar fenotipsko spominja na sorto 'frantoio', podobno velja za sorti 'les' in 'leccino'. Zaradi nejasnosti, ali gre za popolnoma različne sorte ali sorte s sinonimi, so Testolin et al. (2000) z mikrosatelitnimi markerji opisali 8 lokalnih sort ('casaliva', 'favarol', 'fort', 'grignan', 'les', 'raza', 'rossanel', 'trep') ter nekaj širše razširjenih italijanskih sort ('coratina', 'frantoio', 'leccino', 'maurino' in 'pendolino'). Opis DNA sort z mikrosatelitnimi markerji (genotipiziranje DNA) je pokazal, da imajo rastline iste sorte, ki uspevajo v različnih oljčnikih, večinoma enak genotip. Razlike, ki so jih odkrili znotraj nekaterih sort, pri-

pisujejo akumulirano mutacij v daljšem časovnem obdobju. Na osnovi primerjave genotipov sorte 'casaliva' in 'frantoio' menijo, da 'casaliva' pripada sortni populaciji 'frantoio', vendar gre za dve različni sorti. Enako velja tudi za sorti 'leccino' in 'les'.

Sorta 'oblonga' izvira iz Kalifornije (Corning), kjer so jo kot spontani sejanec odkrili okrog leta 1940. Glavna lastnost sorte je dobra odpornost proti *Verticillium dahliae*. Iz Kalifornije so jo prinesli v gensko banko v Cordobi. 'Frantoio' je znana kot pomembnejša sorta v osrednji Italiji, kjer jo gojijo že več sto let. Zaradi izredne kakovosti oljčnega olja je bila prenešena v številne države, vključno z Argentino, Južnoafriško republiko, Avstralijo in ZDA. V genski banki so odkrili, da sta sorti 'oblonga' in 'frantoio' fenotipsko identični, zato so preučili njune morfološke, agronomske lastnosti ter primerjali njuno DNA z mikrosatelitnimi markerji in markerji RAPD. Sorti 'oblonga' in 'frantoio' imata enake profile RAPD, enake alele na vseh mikrosatelitnih lokusih, razlik niso odkrili tudi pri primerjavi 15 morfoloških znakov (list, plod, endokarp) in 8 agronomskih lastnosti. Na osnovi molekularnih in morfoloških analiz avtorji domnevajo, da gre za isto sorto (Barranco et al., 2000).

V Sloveniji smo s predhodno izoliranimi mikrosatelitnimi markerji (Seč et al., 2000) natančneje preučili 19 sort iz kolekcijskega nasada. Visoka informativnost mikrosatelitov je omogočila razločevanje med vsemi analiziranimi sortami. Pri primerjanju posameznih genotipov sort smo odkrili določeno podobnost med slovenskimi in toskanskimi sortami, kar lahko nakazuje, da so slovenske sorte z lokalno selekcijo na regionalni ravni nastale ravno iz italijanskih. Rezultati raziskave nam bodo omogočili identifikacijo sort, kontrolo izvora vegetativno razmnoženega rastlinskega materiala oljke in sadik ter pripomogli k boljšemu poznavanju in nastanku sortne strukture oljk v slovenski Istri. Predstavljeno opisovanje DNA sort z mikrosatelitnimi markerji je med prvimi tovrstnimi študijami na področju oljkarstva (Bandelj et al., 2002).

GENETIC STUDIES IN OLIVES

Dunja BANDELJ MAVSAR

Institute for Mediterranean agriculture and olive growing, Science and Research Centre of the Republic of Slovenia,
Koper, SI-6000 Koper, Garibaldijska 18
E-mail: Dunja.Bandelj@zrs-kp.si

Jernej JAKŠE & Branka JAVORNIK

Centre for Plant Biotechnology and Breeding, Department of Agronomy, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana,
SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

SUMMARY

The olive tree has been cultivated for millennia in the Mediterranean basin, where it happens to be one of the most important crops. The recognition of olive oil as a healthy source of fats in relation to other vegetable fats

increases its demand and consequently the need for more trait oriented breeding to develop new cultivars. In this respect, evaluation of olive germplasms has been recognized as very important, since collected germplasms can be a useful source of traits, not traditionally accounted for in olive selection in the past, but important for modern olive growing. In comparison to other horticultural plants with which significant improvements have been achieved using molecular genetic knowledge, relatively limited molecular research has been carried out in olives. Current genetic research and future orientations in relation to germplasm evaluation, genetic diversity studies and cultivar typing, including our own results, are discussed in this review.

Key words: olive, *Olea europaea*, molecular markers, genetic diversity

LITERATURA

- Amane, M., R. Lumaret, V. Hany, N. Ouazzani, C. Debain, G. Vivier & M. F. Deguilloux (1999): Chloroplast-DNA variation in cultivated and wild olive (*Olea europaea* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 99, 133-139.
- Amane, M., N. Ouazzani, R. Lumaret & C. Debain (2000): Chloroplast DNA variation in cultivated and wild olive (*Olea europaea* L.) of Morocco. *Euphytica*, 116, 59-64.
- Angiolillo, A., M. Mencuccini & L. Baldoni (1999): Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. *Theor. Appl. Genet.*, 98, 411-421.
- Bandelj, D., J. Jakše & B. Javornik (2001): Identification of olive (*Olea europaea* L.) cultivars by molecular markers. *Res. Reports. Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Agricultural Issue 77*, 11-17.
- Bandelj, D., J. Jakše & B. Javornik (2002): DNA fingerprinting of olive varieties by microsatellite markers. *Food Technol. Biotechnol.*, 40, 191-197.
- Barranco, D., I. Trujillo & P. Rallo (2000): Are 'Oblonga' and 'Frantoio' olives the same cultivar? *Hort Science*, 35, 1323-1325.
- Belaj, A., I. Trujillo, R. de la Rosa, L. Rallo & M. J. Giménez (2001): Polymorphism and discrimination capacity of randomly amplified polymorphic markers in an olive germplasm bank. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 126, 64-71.
- Belaj, A., Z. Satović, L. Rallo & I. Trujillo (2002): Genetic diversity and relationships in olive (*Olea europaea* L.) germplasm collections as determined by randomly amplified polymorphic DNA. *Theor. Appl. Genet.*, 105, 638-644.
- Besnard, G. & A. Bervillé (2000): Multiple origin for Mediterranean olive (*Olea europaea* L. ssp. *europaea*) based upon mitochondrial DNA polymorphism. *Acad. Sci. Paris/Life Sci.*, 323, 173-181.
- Besnard, G., P. Baradat & A. Bervillé (2001): Genetic relationships in the olive (*Olea europaea* L.) reflect multilocal selection of cultivars. *Theor. Appl. Genet.*, 102, 251-258.
- Besnard, G., B. Khadari, P. Baradat & A. Bervillé (2002): *Olea europaea* (Oleaceae) phylogeography based on chloroplast DNA polymorphism. *Theor. Appl. Genet.*, 104, 1353-1361.
- Bronzini de Caraffa, V., J. Maury, C. Gambotti, C. Breton, A. Bervillé & J. Giannettini (2002): Mitochondrial DNA variation and RAPD markers in olive and feral olive from Western and Eastern Mediterranean. *Theor. Appl. Genet.*, 104, 1209-1216.
- Caballero, J. M. & C. del Rio (1999): Conservazione delle risorse genetiche dell'olivo. *Zbornik mednarodnega seminarja "Genetic resources"*. Firenze, Italija, s. 1-20.
- Cantini, C., A. Cimato & G. Sani (1999): Morphological evaluation of olive germplasm present in Tuscany region. *Euphytica*, 109, 173-181.
- 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.
- Cavagnaro, P., J. Juarez, M. Bauzá & R. W. Masuelli (2001): Discriminación de variedades de olivo a través del uso de caracteres morfológicos y de marcadores moleculares. *AgriScientia*, 18, 27-35.
- Cervera, M. T., J. A. Cabezas, J. C. Sancha, F. Martinez de Toda & J. M. Martinez-Zapater (1998): Application of AFLPs to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. genetic resources. A case study with accessions from Rioja (Spain). *Theor. Appl. Genet.*, 97, 51-59.
- Ciferri, R., M. Marinucci & A. Morettini (1942): Dati preliminari per una sistematica della razze di olivo in coltura. *L'Olivicoltura*, 1, 3-7.
- 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.
- Claros, M. G., R. Crespillo, M. L. Aguilar & F. M. Cánovas (2000): DNA fingerprinting and classification of geographically related genotypes of olive-tree (*Olea europaea* L.). *Euphytica*, 116, 131-142.
- Fabbri, A., J. I. Hormaza & V. S. Polito (1995): Random amplified polymorphic DNA analysis of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 120, 538-542.

- Fiorino, P. & L. Rallo (1999):** Miglioramento genetico in olivo (*Olea europaea* L.). Zbornik mednarodnega seminarja "Genetic resources". Firenze, Italija, s. 1-24.
- Fontanazza, G. (1996):** Genetic aspects and propagation techniques for intensive cultivation. In: COI, World Olive Encyclopaedia, EGEDSA. Sabadell, Španija, s. 122-134.
- Green, P. S. & G. E. Wickens (1989):** The *Olea europaea* complex. In: Kit Tan (ed.): The Davis & Hedge Festschrift. Edinburgh University Press, Edinburgh, s. 287-299.
- Gregoriou, C. (1996):** Assessment of variation of landraces of olive tree in Cyprus. *Euphytica*, 87, 173-176.
- Jakše, J., K. Kindlhofer & B. Javornik (2001):** Assessment of genetic variation and differentiation of hop genotypes by microsatellite and AFLP markers. *Genome*, 44, 773-782.
- Javornik, B. (1996):** Specifične metode genske tehnologije pri rastlinah - analiza genoma. V: Raspor, P. (ur.): Biotehnologija. BIA d.o.o., Ljubljana, 292 str.
- Khadari, B., N. Moutier & F. Dosba (2001):** Molecular characterisation of French olive varieties: Construction of a database of reference genotypes. *Olivae*, 87, 29-32.
- Koprivnjak, O. & Đ. Prižetić (2000):** Autochthonous olive cultivars in Istria - quality and morphological characteristics of oil: Preliminary results. Zbornik konference "Perspectives for horticulture and viticulture in the alpine region in the third millennium". Udine, Italija, s. 216-220.
- Leva, A. R., G. Montagni & R. Petruccelli (2000):** Risposta agronomica di olivi micropropagati. Zbornik strokovnega posveta "Sredozemsko kmetijstvo in oljkarstvo". 11. november 1999, Izola, Slovenija, s. 101-104.
- Levanič, T., V. Vesel & D. Bandelj (2000):** Poizkus razlikovanja sort oljk v slovenski Istri na osnovi morfoloških znakov endokarpa. Zbornik strokovnega posveta "Sredozemsko kmetijstvo in oljkarstvo". 11. november 1999, Izola, Slovenija, s. 93-99.
- Loukas, M. & C. B. Krimbas (1983):** History of olive cultivars based on their genetic distances. *Journ. of Hort. Sci.*, 58, 121-127.
- Maughan, P. J., M. A. Sanghai Maroof, G. R. Buss & G. M. Huestis (1996):** Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: Species diversity, inheritance, and near-isogenic line analysis. *Theor. Appl. Genet.*, 93, 392-401.
- Mekuria, G. T., G. Collins & M. Sedgley (2002):** Genetic diversity within an isolated olive (*Olea europaea* L.) population in relation to feral spread. *Scientia Horticulturae*, 94, 91-105.
- Mencuccini, M., M. Micheli, A. Angiolillo & L. Baldoni (1998):** Primi risultati nella trasformazione genetica dell'olivo mediante l'impiego di agrobatteri. *Olio & Olio*, 4, 61-64.
- Morgante, M. & A. M. Olivieri (1993):** PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.*, 3, 175-182.
- Ouazzani, N., R. Lumaret & P. Villemur (1996):** Genetic variation in the olive tree (*Olea europaea* L.) cultivated in Morocco. *Euphytica*, 91, 9-20.
- Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey & A. Rafalski (1996):** The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breed.*, 2, 225-238.
- Rallo, L. (1999):** Miglioramento delle risorse genetiche. Zbornik mednarodnega seminarja "Genetic resources". Firenze, Italija, s. 1-28.
- Rallo, P., G. Dorado & A. Martin (2000):** Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 101, 984-989.
- Sanz-Cortés, F., M. L. Badenes, S. Paz, A. Iñiguez & G. Llácer (2001):** Molecular characterization of olive cultivars using RAPD markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 126, 7-12.
- 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.
- Sharma, S. K., M. R. Knox & T. H. N. Ellis (1996):** AFLP analysis of the diversity and phylogeny of *Lens* and its comparison with RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.*, 93, 751-758.
- Standardi, A., M. Micheli & E. Piccioni (1998):** Propagazione 'in vitro' dell'olivo: acquisizione e prospettive. *Rivista di frutticoltura e di ortofloricoltura*, 7/8, 19-23.
- Testolin, R., G. Cipriani, T. Marazzo, R. Marconi & A. Cimato (2000):** Identificazione genetica delle varietà di olivo del Garda. *L'Informatore Agrario*, 34, 1-6.
- Trujillo, I., L. Rallo & P. Arús (1995):** Identifying olive cultivars by isozyme analysis. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 120, 318-324.
- Vergari, G., M. Patumi, F. Bartolozzi & G. Fontanazza (1998):** Utilizzo di marcatori RAPD per la discriminazione di varietà di olivo appartenenti alla popolazione varietale di 'Frantoio'. *Olivae*, 73, 31-36.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper & M. Zabeau (1995):** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, 23, 4407-4414.
- Wiesman, Z., N. Avidan, S. Lavee & B. Quebedeaux (1998):** Molecular characterization of common olive varieties in Israel and the West Bank using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 123, 837-841.
- Zohary, D. & P. Spiegel-Roy (1975):** Beginnings of fruit growing in the Old World. *Science*, 187, 319-327.