

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2012-05/1

ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH CILJNEGA RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	V4-1056
Naslov projekta	Determinacija in vrednotenje genskih virov oljk v nacionalnih kolekcijah Slovenije z uporabo markerjev DNA
Vodja projekta	20038 Dunja Bandelj
Naziv težišča v okviru CRP	5.06.04 Determinacija in valorizacija sort oljk v nacionalnih kolekcijskih nasadih in na širšem pridelovalnem območju
Obseg raziskovalnih ur	1005
Cenovni razred	D
Trajanje projekta	10.2010 - 09.2012
Nosilna raziskovalna organizacija	1510 Univerza na Primorskem, Znanstveno-raziskovalno središče Koper Università del Litorale Centro di ricerche scientifiche di Capodistria
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	4 BIOTEHNIKA 4.03 Rastlinska produkcija in predelava 4.03.01 Kmetijske rastline
Družbeno-ekonomski cilj	08. Kmetijstvo

2. Raziskovalno področje po šifrantu FOS¹

Šifra	4.01
- Veda	4 Kmetijske vede
- Področje	4.01 Kmetijstvo, gozdarstvo in ribištvo

3. Sofinancerji²

	Sofinancerji	
1.	Naziv	Ministrstvo za kmetijstvo in okolje RS
	Naslov	Dunajska 22, 1000 Ljubljana

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

4. Povzetek projekta³

SLO

V Sloveniji se je sortna struktura oljk v 20. stoletju močno spremenila. Mnoge sorte, ki so se stoletja gojile na območju Slovenske Istre iz oljčnikov izginjajo. Da bi preprečili izgubo dragocenih ekotipov oljk, ki predstavljajo nacionalni genski bazen, se je v Sloveniji v letu 1998 pričelo z inventarizacijo sort na terenu. Številna oljna drevesa s posebnimi morfološkimi lastnostmi so bila evidentirana in zbrana v dveh nacionalnih kolekcijskih nasadih v Strunjanu in Purisimi. V kolekcijah poteka agronomsko vrednotenje sort, ekotipov in neznanih genotipov. Identifikacija sort na osnovi morfoloških karakteristik je problematična zaradi prisotnosti sinonimov, homonimov ter odsotnosti standardov, na katere bi nedeterminirane sorte primerjali.

Pri upravljanju kolekcij pogosto pride do zamenjave sadilnega materiala in sadilnih mest, zato je pregled kolekcije z metodami, ki omogočajo nedvoumno identifikacijo nujen, da bi preprečili napačno vrednotenje zbranih genotipov. V Sloveniji kolekcije oljk še niso bile ustrezno pregledane. V Sloveniji gojimo oljko v Istri in v Brdih, določene sorte so prisotne le v Brdih, druge pa samo v Istri, a primerjalna študija o diverziteti ali identičnosti istoimenskih sort z markerji DNA še ni bila opravljena. Vodilna sorta v Sloveniji je 'Istrska belica' in pridelovalci opozarjajo, da obstajajo problemi z rodnostjo te sorte, zato projekt predvideva določitev najpogostejših oprasovalcev 'Istrske belice'. Na področju kemometričnega vrednotenja oljčnih sort in olja v Sloveniji so bili uporabljeni različni pristopi, metode in laboratorijska oprema, zato projekt predvideva harmonizacijo rezultatov med inštitucijami.

Z razvojem DNA markerskih sistemov so na voljo številne različne tehnike, ki jih lahko uporabimo za študije diverzitet in druge aplikacije v kmetijstvu. Projekt vključuje uporabo modernih biotehnoških pristopov in molekularnih orodij za reševanje aktualne problematike oljkarstva v Sloveniji. Cilji projekta so: 1) determinacija neznanih genotipov oljk z markerji DNA, ki so bili predhodno odkriti z inventarizacijo na terenu ter morfološko opisani; 2) uvedba markerjev DNA v upravljanje kolekcij oljk s pregledom in identifikacijo sadilnih mest oljk v dveh nacionalnih kolekcijskih nasadih; 3) primerjava profilov DNA tradicionalnih sort pridelovalnih območij Istre in Brd za ugotavljanje diverzitet ali identičnosti gojenih sort med območjema; 4) izdelava starševskega testa z mikrosatelitskimi markerji za določitev optimalnih oprasovalcev sorte 'Istrska belica'; 5) nadgradnja podatkov oljčnih sort z morfološkimi in kemijskimi profili (kemometrična obdelava). Rezultati projekta bodo služili kot osnova za razvoj strategije za nacionalno upravljanje z genskimi viri oljk v Sloveniji.

ANG

In Slovenia, the structure of olive variety in the 20th century has been changed significantly. Many varieties that have been grown for centuries in the Slovenian Istria are disappearing from the olive orchards. In order to prevent the loss of valuable olive ecotypes which represent a national gene pool, the inventory of varieties in the field was started in 1998. Many olive trees showing specific morphological characteristics were collected and planted in two national collections in Strunjan and Purisima. In collections agronomic evaluation of varieties, ecotypes and unknown genotypes is performed. Identification of varieties based on morphological characters is problematic due to the presence of synonyms, homonyms, and absence of standards on which undetermined varieties can be compared.

During the management of collections, planting material and sites are often mixed, thus the screening of collections by methods that allow unambiguous identification of planted material is necessary to prevent wrong evaluation of collected genotypes. In Slovenia, olive collections have not been appropriate examined yet. In Slovenia olives grow in the region of Istria and Brda. Define varieties are presented only in Brda growing region, and others are prevailing in Istria. A comparative study of diversity or identity of varieties with the same name and with use of DNA markers has not been carried out yet. The leading variety in Slovenia is 'Istrska belica', and growers have noted that there are problems with fertility of this variety, so the project plans the determination of the most common pollinators of 'Istrska belica'. In the field of the chemometric evaluation of olive varieties and oil, different approaches, methods and laboratory equipment have been used in Slovenia, and the project aims to harmonize results between institutions.

With development of DNA marker systems, many different techniques for diversity studies and other applications in agriculture are available. The project includes the use of modern biotechnological approaches and molecular tools for solving actual problems in olive growing in Slovenia.

The aims of the project are: 1) to determine unknown olive genotypes that were previously discovered in the field and morphologically described by use of DNA markers; 2) to introduce the use of DNA markers for olive collections management by reviewing and identifying olive planting sites in two national collections; 3) to compare DNA profiles of traditional varieties growing in Istria and Brda in order to determine the diversity or identity of the cultivated varieties between regions; 4) to perform the paternity analysis by microsatellite markers in order to determine optimal pollinators of 'Istrska belica'; 5) to upgrade the data of olive varieties with morphological and chemical profiles (chemometric analysis). Results of the project will be base for development of the strategy for national management of olive genetic resources in Slovenia.

5. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu⁴

Oljčno olje ima pomembno vlogo v prehrani človeka, saj vsebuje številne, biološko aktivne spojine. V Sloveniji je bilo oljčno olje z zaščiteno označbo porekla 'Ekstra deviško oljčno olje Slovenske Istre' prvo slovensko živilo vpisano v EU register živil oziroma pridelkov z zaščiteno označbo porekla (Uredba Komisije ES št. 148/2007). Pomemben element tipičnosti oljčnega olja je prav sortni izbor zaščitene območja, zato je valorizacija genskih virov oljk pridelovalnega območja nujna, še posebej v luči izgubljanja raznovrstnosti sort ali t.i. genski eroziji, o kateri poročajo tudi pri oljkarstvu. Gensko erozijo pripisujejo pretekli globalizaciji kmetijstva, ki je pridelavo usmerjala v uporabo najbolj donosnih sort ter zato zožila genetski material na nekaj sort. Posledica tega procesa je izguba tradicionalnih sort, ki pa so s stališča ekologije bolje prilagojene okoljskim razmeram pridelovalnega območja. V Sloveniji se je sortna struktura oljk v 20. stoletju močno spremenila. Tradicionalne sorte so zaradi različnih vzrokov nadomestile v slovenski prostor vnesene sorte iz tujine. Z namenom, da bi preprečili izgubo dragocenih genotipov, ki so s stališča žlahtnjenja oljke lahko nosilci odpornostnih genov ter predstavljajo nacionalni genski bazen, se je v Sloveniji pričelo z inventarizacijo sort na terenu. S pregledom terena so bila evidentirana drevesa s posebnimi morfološki lastnostmi, ki pa so zaradi omejitve uporabnosti morfologije v večji meri ostala neidentificirana. Rastlinski material evidentiran na terenu, je bil kasneje razmnožen in posajen v dve nacionalni kolekciji (Strunjan in Purisima). Pri slednji je prišlo do pomešanja sadik pri saditvi, zato sadilna mesta v kolekciji niso pravilno identificirana, kar pa predstavlja resen problem pri vrednotenju zbranih sort. Osrednjo problematiko identifikacije oljčnih sort v Sloveniji predstavlja tudi odsotnost standardnih sort, na katere bi lahko identificirali vzorce sort iz terena, saj imajo mnoga drevesa le delovno ime in nepreverjeno identiteto. Prisotnost homonimov in sinonimov še dodatno otežuje sortno identifikacijo. Prisotna je tudi zmeda pri poimenovanju sort domnevno istih sort v dveh pridelovalnih območjih oljk: Slovenski Istri in goriških Brdih.

Kontradiktornosti se pojavljajo tudi pri določanju kompatibilnosti različnih sort v kontekstu uspešne oploditve in rodnosti. S stališča doseganja višjih in rednih pridelkov ter preprečevanja izmenične rodnosti je določitev oprasha valnih sort za gospodarsko pomembne sorte izrednega pomena pri pripravi novih nasadov.

Aktualno problematiko genskih virov oljk s katero se srečujemo v Sloveniji lahko rešujemo z uporabo metod rastlinske biotehnologije. Razvoj markerjev DNA je proučevanje rastlin popeljal na nivo molekule DNA, kar omogoča raziskave genotipov neodvisno od okoljskih dejavnikov.

Raziskovalne hipoteze: 1) S pomočjo markerjev DNA uspešno determinirati neznane genotip oljk, ki so bili predhodno odkriti z inventarizacijo na terenu ter morfološko opisani; 2) uspešno uvedeni markerji DNA v upravljanje kolekcij oljk s pregledom in identifikacijo sadilnih mest oljk v nacionalnih kolekcijskih nasadih Strunjan in Purisima; 3) opravljena primerjava genetskih - DNA profilov sort, ki uspevajo v pridelovalnih območjih Slovenske Istre in Brd; 4) izdelava starševskega testa z mikrosatelitskimi markerji za določitev optimalnih oprasha valcev sorte 'Istrska belica' in ugotovitev kompatibilnosti sort; 5) izdelana nadgradnja podatkovne baze z morfološkimi in kemijskimi profili ter zbrani podatki oljčnih olj v obdobju od 1992-2010.

Opis raziskovanja in metode dela:

Terensko delo: V sodelovanju s PCO (Poskusni center za oljkarstvo), ki deluje v okviru KGZS-Zavod Gorica so bili vzorčeni nacionalni kolekcijski nasadi oljk v Strunjanu in Purisimi. Na vsakem sadilnem mestu v nasadu je bil odvzet vzorec listov, iz katerega je bila izolirana celokupna DNA. Za primerjavo sort oljk iz Brd in Istre, so bila vzorčena drevesa v Brdih v sodelovanju s Kmetijsko svetovalno službo Zavoda Gorica. Za identifikacijo nedeterminiranih sort na terenu oziroma sort z delovnimi imeni, so bila vzorčena drevesa v sodelovanju s PCO. Za določitev donorjev peloda

vodilne sorte 'Istrska belica' so bili nabrani vzorci plodov te sorte v času zorenja v enosortnem (Osp) in mešanem nasadu (Strunjan).

Laboratorijsko delo: Iz nabranih listov oljk smo izolirali DNA s postopki ekstrakcije po protokolu Kump in sod. (1992). Za izolacije DNA iz embrijev oljk, smo zaradi majhne količine materiala postopek ekstrakcije modificirali. Po izolaciji smo zmerili koncentracijo DNA ter pripravili vzorce na genotipizacijo. Uporabili smo dva markerska sistema: mikrosatelite in markerje RAPD. Markerski sistem RAPD smo uporabili za pregled kolekcije. Pomnožene markerje RAPD smo ločili z agarozno elektroforezo. Genotipizacijo z mikrosateliti pa smo opravili na sekvenčni napravi ABI. Rezultate smo statistično ovrednotili s programi CERVUS; IDENTITY, MICROSAT, NTSYS in FAMOZ.

Kabinetno delo: Delo se je osredotočalo na pregled baze podatkov o slovenskih oljčnih olj. Po letu 2000 so se podatki o značilnostih slovenskega oljčnega olja in karakterizaciji sortnega olja zbirali neuskladjeno v okviru treh institucij, zato je bilo nujno potrebno zbrane podatke pregledati in jih ovrednotiti (z vidika relevantnosti metodologije), zapolniti nekatere vrzeli, statistično obdelati in diseminirati.

Ključne ugotovitve in znanstvena spoznanja:

-Identifikacija neznanih genotipov na terenu: genotipizacija je bila opravljena na 104 drevesih, za primerjavo profilov neznanih genotipov na terenu smo kot referenčne sorte uporabili profile DNA sort iz kolekcije v Strunjanu in na Purisimi (33 referenčnih sort). Popolno identifikacijo smo lahko določili pri 61 drevesih (58,7 % analiziranih dreves), pri 7 (6,7 %) drevesih smo ugotovili domnevno identifikacijo (razlike obstajajo na določenih lokusih), pri 36 drevesih (34,6 %) pa smo ugotovili, da genetski profili ne pripadajo nobeni referenčni sorti, kar pomeni, da v Sloveniji za te genotipe nimamo standardov.

-Pregled kolekcije Strunjan: genotipizacija je bila opravljena na 100 drevesih, ki so domnevno pripadala 27 različnim sortam. Rezultati so pokazali, da je v kolekciji zbranih 23 sort, ki lahko služijo kot referenčne sorte z zanesljivo identifikacijo (Arbequina, Athena, Belica Pucer, Buga, Cipressino, Coratina, Črnica, Frantoio, Grignan, Itrana, Leccino, Leccio del corno, Leccione, Maurino, Moraiolo, Nocelara del Belice, Pendolino, Picholine, Rozi, Samo, Samo Nova vas, Štorta, Zelenjak viseča). Pri dveh sortah (Ascolana tenera in Santa Caterina) pa smo znotraj sort odkrili po dva različna genotipa, kar je najbrž posledica poliklonskega značaja oljk, vendar v tem primeru sorti nista z gotovostjo referenčni. Za potrditev identitete teh dveh sort bi bilo potrebno profile DNA primerjati s profili referenčnih dreves iz svetovne genske banke oljke v Španiji. V enem primeru smo razrešili dilemo sadilnega mesta; na sadilnem mestu 'Rozi' uspeva sorta 'Buga'. Kolekcija je bila pravilno pripravljena in je primerna za vrednotenje sort.

-Pregled kolekcije Purisima: Genotipizacija je bila opravljena na 173 drevesih, ki naj bi pripadala 37 različnim sortam. Rezultati analize so pokazali, da je bilo kar 59 sadilnih mest v kolekciji napačno označenih (34 % vseh mest), ki pa smo jih s pomočjo mikrosatelitov uspešno identificirali. Genotipizacija na 7-ih mikrosatelitskih lokusih je pokazala, da v kolekciji kot referenčne sorte lahko obravnavamo le 19 sort od 37 zbranih: Arbequina, Belica Pucer, Buga, Cipressino, Coratina, Črnica, Frantoio, Leccino, Leccio del corno, Leccione, Maurino, Moraiolo, Nocelara del Belice, Pendolino, Picholine, Samo, Samo Nova vas, Štorta, Zelenjak viseča. Pri preostalih 31 drevesih smo odkrili še 11 različnih in edinstvenih genotipov, ki pa se ne ujemajo s profili referenčnih sort oz. za te genotipe v Sloveniji nimamo standardov. V primeru, če bi bila objavljena svetovna podatkovna baza genotipizacije vseh oljčnih sort z mikrosateliti, bi te sorte lahko identificirali. Na osnovi rezultatov lahko zaključimo, da kolekcija na Purisimi ni bila dobro pripravljena, zato uporabnikom ni prijazna ter ob vzorčenju rastlinskega materiala zahteva prisotnosti poznavalca kolekcije.

-Primerjava genetskih profilov sort iz Brd in Istre: Pri osmih sortah nismo odkrili razlik, pri treh starejših sortah (Črnica, Buga, Drobnica) pa smo dokazali obstoj homonimov, kar dokazuje, da v dveh pridelovalnih območjih ne gojimo popolnoma identičen genetski material.

-Izvedba starševskega testa pri sorti 'Istrska belica' je pokazala, da so najbolj potencialni očetje sorte 'Istrska belica' v enosortnem nasadu Leccione, Leccino, Leccio del corno, Ascolana tenera, Picholine, Črnica, Buga in Grignan. Med vsemi analiziranimi embriji 'Istrske belice' nismo odkrili nobenega primera avtofertilnosti, kar pomeni, da se ta sorta najverjetneje preferenčno oplodi s tujim pelodom. Pri tem bi bilo smiselno preveriti ali je sorta dejansko samooplodna s pomočjo izolacije cvetov.

-Kemometrična analiza oljčnih olj: za slovensko morfološko in kemijsko bazo podatkov je značilna velika količina podatkov, ki jih statistično ni mogoče obdelati zaradi nesistematičnega pristopa (3 zaporedna leta, čas vzorčenja in čas opravljene analize itd), zato je nujno potrebno dodelati slovensko bazo podatkov z manjkajočimi elementi in se strateško odločiti za nadaljnje delo na področju sortne karakterizacije.

Rezultati in učinki projekta

Ključni rezultat projekta je izdelana podatkovna baza oljčnih sort, ki uspevajo v Sloveniji in določitev referenčnih sort. Genetsko profiliranje kolekcij je nujno potrebno za pravilno identifikacijo

sort in za pridobivanje relevantnih rezultatov vrednotenja genskih virov oljk. V Sloveniji sta bila z markerji DNA pregledana oba nacionalna kolekcijaska nasada v Strunjanu in na Purisimi. Sadilna mesta v Strunjanu so pravilno identificirana in kolekcija je bila skrbno pripravljena, v nasadu je zbranih 23 sort, ki lahko služijo kot referenčne sorte pridelovalnega območja. Na Purisimi pa smo z analizo odkrili napačno označena sadilna mesta (34 % mest), ki pa smo jih lahko s pomočjo markerjev DNA pravilno identificirali. V tej kolekciji lahko kot referenčne sorte uporabimo le 19 sort od 37-ih. Preostali vzorci v tej kolekciji so bili genetsko profilirani, vendar za sortno identifikacijo nimamo standardov. Drevesa pripadajo 11-im različnim genotipom, torej je v tej kolekciji zbrano 32 različnih sort. Enajst genotipov je večinoma poimenovanih z delovnimi imeni, zato predlagamo, da tako poimenovanje ostane tudi v prihodnosti. Na osnovi rezultatov genotipizacije, smo izdelali tudi novo shemo sadilnih mest za kolekcijo Purisima. S pomočjo določenih referenčnih sort smo lahko identificirali 58,7 % neznanih genotipov oljk na terenu, preostali del genotipov, ki so na terenu zastopani z enim drevesom nismo uspeli identificirati ali pripisati določeni referenčni sorti, kar dokazuje, da imamo v Sloveniji na terenu izjemno genetsko pestrost oljk. Določene sorte s terena so bile že prenesene v kolekcijo na Purisimi, nekatere pa ne, zato bi bilo smiselno pripraviti v Sloveniji še eno kolekcijo, ki bi vsebovala te genotipe, saj jim sicer grozi genetska erozija. Presenetljive rezultate smo pridobili tudi pri ugotavljanju donorjev peloda pri sorti 'Istrska belica'. Sorta naj bi bila samooplodna, rezultati pa so pokazali, da se preferenčno oplaja s pelodom drugih sort. Rezultati projekta so ključno doprinesli k poznavanju genetskega materiala oljke v Sloveniji in so osnova za nadaljnjo načrtovanje upravljanja genskih virov oljk v Sloveniji.

Rezultati po delovnih sklopih so prikazani v Prilogi projekta.

6. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem in zastavljenih raziskovalnih ciljev⁵

Raziskovalna skupina ocenjuje, da je bil program dela na projektu realiziran v celoti. S pomočjo markerjev DNA smo uspešno determinirali neznan genotip oljk, ki so bili predhodno odkriti z inventarizacijo na terenu ter morfološko opisani (1). Uspešno smo uvedli markerje DNA v upravljanje nacionalnih kolekcij oljk v Strunjanu in Purisimi in pregledali vsa sadilna mesta oljk ter preverili identiteto dreves (2). Primerjali smo genetske profile istoimenskih sort oljk, ki uspevajo v Istri in Brdih (3). Izvedli smo starševski test na sorti 'Istrska belica' z mikrosatelitskimi markerji in določili najpogostejše opraševalce te sorte (4). Nadgrajena je bila tudi podatkovna baza z morfološkimi in kemijskimi profili ter zbrani podatki v obdobju oljčnih oljk v obdobju med 1992 in 2010 (5). Rezultati raziskave so pokazali, da je bila genotipizacija z markerji DNA dreves, ki so zbrana v nacionalnih kolekcijah nujna za preprečevanje napačnega vrednotenja oljčnih genotipov. Z vzpostavljeno podatkovno bazo genetskih profilov oljčnih sort, bo mogoče primerjati diverzitetu genskih virov oljk v nacionalnem prostoru s sortami drugih pridelovalnih območij v Sredozemlju. Popis genetskih virov je pomemben tudi s stališča iskanja najprimernejših genotipov za slovensko pridelovalno območje v luči spreminjajočih se vremenskih in podnebnih razmer, ko bo potrebno z ustreznim agronomskim vrednotenjem oceniti katere sorte so najbolj odporne in kakovostne v ekstremnih razmerah kot so suša, močni napadi oljčnih škodljivcev, itd. Zaradi nesistematičnega proučevanja sort in ne zagotavljanja kontinuiranih podatkov na področju kemije, različnih pristopov in različnih uporabljenih metod, statistična obdelava podatkov ni mogoča, zato bi bilo nujno potrebno slovensko podatkovno bazo dodelati z manjkajočimi elementi in določiti strategijo za nadaljnjo delo na področju sortne karakterizacije. Rezultati projekta bodo pripomogli k umestitvi nacionalnih genetskih raziskav oljk v mednarodni raziskovalni prostor in so poglobili sodelovanje med inštitucijami, ki se ukvarjajo z oljko. Tako smo v času projekta poglobili sodelovanje z raziskovalnimi skupinami iz Črne Gore, Hrvaške in Francije, s katerimi načrtujemo skupne objave in projekte na področju genskih virov oljk.

7. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine⁶

Sprememb programa raziskovalnega projekta ali sestave projektne skupine ni bilo.

8. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁷

	Znanstveni dosežek		
1.	COBISS ID	1995219	Vir: COBISS.SI

Naslov	SLO	Znotrajsortna diverziteta hrvaškega oljčnega kultivarja 'Lastovka'
	ANG	Intra-cultivar diversity in the Croatian olive cultivar, 'Lastovka'
Opis	SLO	Hrvaška oljčna sorta 'Lastovka' se uporablja predvsem za pridelavo oljčnega olja. Za sorto 'Lastovka' so značilni visoki pridelki, a hkrati velja za občutljivo na nizke temperature, zato je pridelovalno območje omejeno na otok Korčulo, na jugu Dalmacije. Med pridelavo omenjene sorte so bile opažene različne morfološke oblike. Da bi ugotovili, v kolikšni meri so znotraj sorte prisotne raznolikosti, so pri 47 drevesih sorte 'Lastovka' opisali 11 morfoloških lastnosti, jih pregledali z markerji AFLP ter jih primerjali z desetimi drevesi sorte 'Oblica' in z desetimi drevesi sorte 'Drobnica'. Na podlagi morfoloških in molekularnih analiz so med sortami so odkrili jasne razlike, kar pomeni, da so tovrstne analize zanesljive za razlikovanje med sortami. Z morfološkimi in molekularnimi analizami pa so potrdili tudi raznolikost znotraj sorte 'Lastovka', kar nudi možnosti za izbor potencialno najboljših klonov.
	ANG	The Croatian olive (<i>Olea europaea</i> L.) cultivar, 'Lastovka', is mainly used for oil production. While fruit yields are high and regular, the growing area is limited due to its sensitivity to low temperatures, with production concentrated on the South Dalmatian island of Korčula. Different morphological types have been observed during production. In order to determine the extent of intra-cultivar diversity, 47 individual 'Lastovka' trees were analyzed for 11 morphological traits and assessed using AFLP markers, and compared to ten trees each of the cultivars 'Oblica' and 'Drobnica'. Clear differentiation among cultivars was detected, and the results showed that both the morphological and molecular data were equally reliable for discriminating between cultivars. The existence of intra-cultivar diversity in 'Lastovka' was therefore confirmed at both the morphological and molecular levels, providing an opportunity for the selection of potentially superior clones.
Objavljeno v	Headley Brothers Ltd.; The journal of horticultural science & biotechnology; 2011; 86, 3; str. 305-311; Impact Factor: 0.637; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.028; WoS: MU; Avtorji / Authors: Strikić Frane, Liber Zlatko, Bandelj Mavsar Dunja, Čmelik Zlatko, Perica Slavko, Radunić Mira, Javornik Branka, Šatović Zlatko	
Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
2. COBISS ID	1806035	Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Pregled in morfološko vrednotenje genskih virov fig (<i>Ficus carica</i> L.) iz Slovenije
	ANG	A survey and morphological evaluation of fig (<i>Ficus carica</i> L.) genetic resources from Slovenia
Opis	SLO	Z namenom, da zbrali obstoječo fenotipsko variabilnost fig, ki uspevajo na obali severnega Jadrana, je bila opravljena inventarizacija družinskih vrtov in nasadov v Sloveniji. Dva glavna pridelovalna območja fig sta bila vključena v inventarizacijo: priobalni pas (slovenska Istra) in notranjost (Goriška Brda in Vipavska dolina). Zbran material je bil morfološko okarakteriziran po metodi, ki jo je izdelal Mednarodni inštitut za rastlinske genske vire, predlagani pa so bili tudi novi deskriptorji za list in plod. Slovenske akcesije (25) so bile primerjane s sortami fig iz zasebne kolekcije na Hrvaškem s ciljem, da bi določili stopnjo podobnosti fig, ki uspevajo na širšem območju Istre. Skupaj je bilo ocenjenih 74 fenotipskih znakov na 38 akcesijah. Za določitev vzorca morfološke raznolikosti znotraj genskih virov fig smo uporabili metodo Principal component analysis (PCA) in izdelali analizo razvrščanja sort v skupine za določitev najbolj informativnih fenotipskih znakov za razvrstitev sort v skupine. Rezultati raziskave so pripomogli k vzpostavitvi nacionalne genske banke fig, v kateri je zbranih 22 različnih genotipov.

		<p>In order to collect all existing phenotypic variation of fig accessions grown in Slovenia and to plan the conservation strategy by establishment of national collection in the northern part of Adriatic coast, the survey of family yards and Slovenian orchards was performed. Two main fig growing regions were included into the field inventory: littoral zone (Slovene Istria) and hinterland zone (Goriška Brda and Vipava Valley). All collected material was morphologically characterized according to the method for <i>Ficus carica</i> L., developed by The International Plant Genetic Resources Institute and some new descriptors for leave and fruits were introduced. Twentyfive Slovenian accessions were compared with fig varieties from a private fig collection in Croatia in order to asses the degree of similarity of figs grown on a broader region of Istria. Altogether 38 accessions were evaluated for 74 phenotypic characters. For identification the patterns of morphological variation within the fig germplasm Principal component analysis (PCA) was used and cluster analysis was performed to determine the most informative phenotype characters for classification of varieties into groups. Research results contributed to the establishment of national fig gene bank in which 22 various genotypes are collected.</p>
	Objavljeno v	Elsevier; Scientia horticultrae; 2010; Vol. 125, iss. 3; str. 380-389; Impact Factor: 1.045;Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 0.979; WoS: MU; Avtorji / Authors: Podgornik Maja, Tomažič Irma, Vrhovnik Irena, Bandelj Mavsar Dunja
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
3.	COBISS ID	1853651 Vir: COBISS.SI
	Naslov	<p><i>SLO</i> Vpliv tehnologije na rast mikroflore in na kakovost namiznih oljk iz slovenske Istre</p> <p><i>ANG</i> The impact of production technology on the growth of indigenous microflora and quality of table olives from Slovenian Istria</p>
	Opis	<p><i>SLO</i> Raziskava se osredotoča na determinacijo vodilnih mikroorganizmov pri spontani fermentaciji namiznih oljk slovenske Istre. S pomočjo molekulske analize ITS regij in tehnike PCR-RFLP so bili identificirani mikroorganizmi. Rezultati so pokazali, da visoka inicialna vsebnost biofenolov v oljčnih plodovih ter njihovo boljše ohranjanje med tradicionalnim postopkom fermentacije vpliva na dinamiko mikrobne populacije in kakovostne karakteristike namiznih oljk.</p> <p><i>ANG</i> The research was focused on determination of leading microorganisms in spontaneous fermentations of table olives in Slovenian Istria. With molecular analysis of ITS regions and PCR-RFLP technique microorganisms have been identified. The results showed that initial high biophenol content in olive fruits and their better preservation during traditional processing influenced microbial population dynamics and quality characteristics of table olives.</p>
	Objavljeno v	Faculty of Food Technology and Biotechnology; Food technology and biotechnology; 2010; Vol. 48, no. 3; str. 404-410; Impact Factor: 0.976;Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.269; WoS: DB, JY; Avtorji / Authors: Valenčič Vasilij, Bandelj Mavsar Dunja, Bučar-Miklavčič Milena, Butinar Bojan, Čadež Neža, Golob Terezija, Raspor Peter, Smole Možina Sonja
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
4.	COBISS ID	3898232 Vir: COBISS.SI
	Naslov	<p><i>SLO</i> Nove izomere vitamina E (gama-tokomonoenola in alfa-tokomonoenola) v semenih, praženih semenih in olju praženih semen slovenske sorte buč 'Slovenska golica'</p> <p>New vitamin E isomers (gamma-tocomonoenol and alpha-tocomonoenol) in</p>

	ANG	seeds, roasted seeds and roasted seed oil from the Slovenian pumpkin variety 'Slovenska golica'
Opis	SLO	<p>Območje Štajerske na severno-vzhodnem delu Slovenije in južne Avstrije imajo dolgoletno tradicijo pridelovanja buč za pridobivanje olja. GC-MS analiza prostih in esterificiranih minornih komponent olja iz praženih buč iz slovenske buče 'Slovenska golica' je razkrila prisotnost dveh do tedaj neobjavljenih izomerov vitamina E: alfa-tokomonoenola in gama-tokomonoenola. Oba sta bila okarakterizirana s pomočjo MS spektrov. Na osnovi podatkov GC-MS, referenčnega vzorca surovega palmovega olja ter tokoferolnih in tokotrienolnih standardov je bilo mogoče s pomočjo HPLC potrditi in koncentracijsko ovrednotiti vsebnost obeh novih oblik vitamina E v olju praženih semen 'Slovenske golice'. Vrednosti sta bili $17,6 \pm 0,6 \mu\text{g/g}$ za alfa-tokomonoenol in $118,7 \pm 1,0 \mu\text{g/g}$ za gama-tokomonoenol. Koncentraciji alfa-tokoferola in gama-tokoferola sta bili $77,9 \pm 1,9 \mu\text{g/g}$ ter $586,0 \pm 4,6 \mu\text{g/g}$, vsaka. Vse koncentracije tokoferolnih izomerov so bile v skladju s predhodno objavljenimi podatki. To pa ne drži za gama-tokotrienol, saj je bila njegova določena vsebnost $6,9 \pm 0,2 \mu\text{g/g}$, kar je znatno manj od podatkov, objavljenih v literaturi. To vrednost je potrdila tudi GC-MS analiza. To neskladje je bilo pojasnjeno z določitvijo gama-tokotrienola v nepraženih in praženih semenih sorte 'Slovenska golica'. Rezultati so pokazali, da je bila vsebnost gama-tokotrienola nizka že od vsega začetka in da se ni zmanjšala med procesom praženja, ravno nasprotno – med procesom je z $1,6 \mu\text{g/g}$ porastla na $2,2 \mu\text{g/g}$.</p>
	ANG	<p>The Štajerska region in north-eastern Slovenia and the Styria region in southern Austria have a long tradition of growing pumpkins as an oil crop. GC-MS determination of the free and esterified minor compounds in oil of roasted pumpkin seeds from the Slovenian Cucurbita pepo L. variety 'Slovenska golica' revealed the presence of two previously unreported compounds: alpha-tocomonoenol and gamma-tocomonoenol. Both compounds have been characterized using MS spectra. According to GC-MS data, reference samples (Crude Palm Oil) and tocopherol and tocotrienol standards it was possible to assign and quantify alpha-tocomonoenol ($17.6 \pm 0.6 \mu\text{g/g}$) and gamma-tocomonoenol ($118.7 \pm 1.0 \mu\text{g/g}$) compounds in roasted 'Slovenska golica' seed oil using HPLC. The concentrations of alpha-tocopherol and gamma-tocopherol were $77.9 \pm 1.9 \mu\text{g/g}$ and $586.0 \pm 4.6 \mu\text{g/g}$, respectively. All concentrations of tocopherols were similar to previously published data. Surprisingly the gamma-tocotrienol concentration found was only $6.9 \pm 0.2 \mu\text{g/g}$. This concentration is significantly lower than reported in the literature and was also confirmed with GC-MS analysis. This discrepancy was explained by determination of gamma-tocotrienols in unroasted and roasted seeds of the variety 'Slovenska golica'. The results showed that the amount of gamma-tocotrienols was low from the beginning and did not decrease during the process of roasting. The opposite situation has been noted; during the process, the amount of gamma-tocotrienols increased from $1.6 \mu\text{g/g}$ to $2.2 \mu\text{g/g}$.</p>
Objavljeno v		Applied Science Publishers; Food chemistry; 2011; Vol. 128, issue 2; str. 505-512; Impact Factor: 3.655; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.379; A': 1; WoS: DW, JY, SA; Avtorji / Authors: Butinar Bojan, Bučar-Miklavčič Milena, Mariani Carlo, Raspor Peter
Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek

9. Najpomembnejši družbeno-ekonomsko relevantni rezultati projektne skupine⁸

	Družbenoekonomsko relevantni dosežki	
1.	COBISS ID	2175443
		Vir: vpis v poročilo

Naslov	SLO	SIGMA2: Čezmejna mreža za sonaravno upravljanje okolja in biotske raznovrstnosti
	ANG	SIGMA2: Cross-border network for the sustainable management of environment and biodiversity
Opis	SLO	Vodenje in koordiniranje mednarodnega strateškega projekta SIGMA2 (Dunja bandelj, coordinator in vodja projekta, vrednost projekta 3,6 mio EUR): Projekt prispeva k ohranjanju biodiverzitete in izboljšanju okolja na čezmejnem območju. Dvanajst inštitucij iz Slovenije in Italije je vključenih v projekt. Projektne aktivnosti se osredotočajo na razvoj okoljskih meodelov za napovedovanje razvojnega cikla oljčnih škodljivcev (oljna muha), spremljanje policikličnih aromatskih ogljikovodikov na čezmejnem območju, študije vpliva kmetijske dejavnosti na biodiverzitetno in vzpostavitev stalne infrastrukture z izgradnjo Centra mediteranskih kultur (CMK), ki bo deloval kot podpora za okoljske, biodiverzitetne in kmetijske projekte na severnem Jadranu. Preliminarni rezultati projekta so bili predstavljeni na mednarodnih znanstvenih konferencah (COBISS ID: 2175443, COBISS.SI-ID 2085843).
	ANG	Leading and coordination of international strategic project SIGMA2 (Dunja Bandelj, coordinator and project leader, project costs: 3.6 million EUR): the project contributes to the conservation of biodiversity and to the improvement of environment on cross-border area. Twelve institutions from Slovenia and Italy are included into the project. Project activities are focused on development of environmental model for prediction of developmental cycle of olive pests (olive fruit fly), monitoring of PAH on cross-board area, study the influence of agricultural activities on biodiversity, and establishment of permanent infrastructure with construction of Mediterranean Crop Centre (MCC) which will support environmental, biodiversity and agricultural projects in the North Adriatic. Preliminary results of the project have been presented on international scientific conference (COBISS ID: 2175443, COBISS.SI-ID 2085843).
Šifra	D.01 Vodenje/koordiniranje (mednarodnih in domačih) projektov	
Objavljeno v	BANDELJ MAVSAR, Dunja (ur.), PODGORNIK, Maja (ur.), ARBEITER, Alenka (ur.). Novi raziskovalni pristopi v oljkarstvu : zbornik znanstvenih prispevkov z mednarodnega posveta : zbornik znanstvenih radova sa međunarodnog susreta. Koper: Univerza na Primorskem, Znanstveno-raziskovalno središče, Univerzitetna založba Annales, 2012, str. 47-54, graf. prikazi.	
Tipologija	1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci	
2. COBISS ID	2094035	Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Inštitut za sredozemsko kmetijstvo in oljkarstvo
	ANG	Institute for Mediterranean agriculture and olive growing
Opis	SLO	Akreditirani laboratorij za preskušanje oljčnega olja dokazuje svojo usposobljenost in skladnost z zahtevami standarda SIST EN ISO / IEC 17025:2005 s potrdilom o akreditaciji, ki ga je izdala Slovenska akreditacija SA, pod številko LP-040. Laboratorij je eden izmed referenčnih laboratorijev na področju referenčnega etalona v Sloveniji. Glavna dejavnost laboratorija je, da vzpostavlja in vzdržuje učinkovit nacionalni sistem za testiranje oljčnega olja v Sloveniji. Laboratorij ima dovoljenje za ugotavljanje skladnosti za potrebe uradnega nadzora in inšpekcijskih pregledov kakovosti. V skladu z resolucijo RES-2/78-IV/98, z dne 4. junija, 1998, o preskuševalnih laboratorijih, je Mednarodni svet za oljčno olje ocenil pristojnosti Laboratorija za preskušanje oljčnih olj z namenom izdaje priznanje. Tako je bil UP ZRS - Laboratorij za preskušanje oljčnega olja priznan za obdobje 2004-2011. Glavna raziskovalna področja so: antioksidanti v oljčnih oljih (sekoiridoidi in tokoli), kemometrijsko

		vrednotenje ekstra deviških oljčnih olj Slovenske Istre, senzorične in s kemijo povezane študije avtohtonih sort oljk, korelacijske in primerjalne študije podatkov vonja in okusa ekstra deviških oljčnih olj.
	ANG	Accredited Laboratory for olive oil testing demonstrates its competence and compliance with the requirements of the Standard SIST EN ISO/IEC 17025:2005 through Accreditation certificate issued by Slovenian Accreditation, SA, under the number LP-040. Laboratory is one of the reference laboratories in the field of the SI unit mol in Slovenia. The main activity of the Laboratory is to establish and maintain the efficient national system of olive oil testing in Slovenia. Laboratory is also authorized to perform conformity assessment for the needs of official control or quality inspections. In compliance with Resolution no. RES-2/78-IV/98 of 4th June 1998 on the certificate of recognition for olive oil testing laboratories, the International Olive Council evaluated the laboratory competence with a view to issuing recognition. UP ZRS – Laboratory for olive oil testing was recognized for the period 2004-2011. The main research fields are: antioxidant substances in olive oils (secoiridoides and tocols), chemometric assessment of extra virgin olive oils from Slovene Istria, sensorial and chemically related studies of autochthonous olive varieties, correlation and comparison studies of head space and sensorial data from extra virgin olive oils.
Šifra	D.05	Akreditacija laboratorija
Objavljeno v	Primorske novice]; Oljka; 2011; Str. [2]; Avtorji / Authors: Bandelj Mavsar Dunja	
Tipologija	1.25	Drugi članki ali sestavki

10. Drugi pomembni rezultati projektne skupine⁹

-3.13 Organiziranje znanstvenih in strokovnih sestankov: Raziskovalci so sodelovali pri organizaciji mednarodne znanstvene konference v okviru projekta ZOOB, Zmanjšanje onesnaževanja in ohranjanje biotske pestrosti v kmetijstvu s poudarkom na oljkarstvu, sofinanciranega v okviru Operativnega programa IPA čezmejnega sodelovanja Slovenija Hrvaška 2007 – 2013. Dvodnevna, mednarodna znanstvena konferenca z naslovom NOVI RAZISKOVALNI PRISTOPI V OLJKARSTVU se je odvijala v Portorožu dne 16. 2. In 17. 2. 2012.

-Mentorstvo pri diplomskih delih (bolonjski študij 1. stopnje): v projekt so bili vključeni študentje študijskih programov 'Biodiverziteteta' in 'Sredozemsko kmetijstvo' na UP FAMNIT, rezultat je zaključna naloga, mentorica Dunja Bandelj: BOŽIČ, Špela. Pregled in identifikacija sadilnih mest oljk v nacionalnem kolekcijem nasadu Strunjan z molekulskimi markerji : zaključna naloga. Koper: [Š. Božič], 2011. 37 f., [1] f. pril., ilustr. [COBISS.SI-ID 2220755].

-Predstavitev delnih rezultatov projekta na mednarodni znanstveni konferenci 'Novi raziskovalni pristopi v oljkarstvu', Portorož 16.-17. 2. 2012 (Genetsko vrednotenje tradicionalnih oljčnih sort Slovenske Istre, COBISS.SI-ID 2175955).

-Promocija slovenskega oljkarstva s samostojnim poglavjem v znanstveni monografiji: Following olive footprints in Slovenia, avtorji: BANDELJ D., DAROVEC D., KASTELIC, E., VALENČIČ V. V: EL-KHOLY, Mohamed (ur.). Following olive footprints (Olea europaea L.) : cultivation and culture, folklore and history, (Scripta Horticulturae, N. 13). [Cairo]: AARINENA; [Madrid]: IOC; [Leuven]: ISHS, [2012], str. 339-350, zvd., ilustr. [COBISS.SI-ID 2271443]

11. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine¹⁰

11.1. Pomen za razvoj znanosti¹¹

SLO

Oljka je ena najstarejših gojenih sadnih vrst na območju sredozemskega bazena, kjer jo gojijo v glavnem za pridobivanje oljčnega olja. Zelo pomembna je tudi z zgodovinskega, kulturnega in gospodarskega vidika in ima ključno vlogo pri ohranjanju pokrajine na določenih območjih. Globalno gledano je pridelava oljk ena najpomembnejših kmetijskih panog in oljčno olje

predstavlja primarni vir maščob v zdravi mediteranski prehrani. Kljub socialno-ekonomski pomembnosti in koristnim zdravilnim učinkom, ki so povezani z uživanjem oljčnega olja, so raziskave na področju genetike oljke nezadostne, da bi lahko razjasnili evolucijo, delovanje in strukturo oljčnega genoma v primerjavi z ostalimi sredozemskimi rastlinami in sadnimi vrstami. Še več, izboljšanje genetskega materiala in žlahtnjenje oljke zaostaja, večinoma zaradi dolge juvenilne dobe po križanju sort, avtofertilnosti nekaterih sort in ohranjanja sort z vegetativnim razmnoževanjem. Posledice navedenega so omejene informacije ali pomanjkanje podatkov o dedovanju agronomsko pomembnih lastnosti. Za izboljšanje genetskega materiala oljk sta torej nujno potrebni karakterizacija in vrednotenje obstoječe biodiverzite ter identifikacija najprimernejših genotipov za gojenje v določeni regiji.

Raziskave oljk na nacionalnem nivoju z markerji DNA in vključevanje rezultatov v mednarodne okvirje, bo ključno pripomoglo k poznavanju ekonomske vrednosti oljčnih sort in obsega diverzitete te vrste. Identifikacija in vrednotenje lokalnih sort, ki so dobro prilagojene ekološkimi dejavnikom določenega okolja so prvi korak v procesu izboljšanja genskih virov oljk.

Izdelana podatkovna baza, ki vsebuje podatke genotipizacije oljčnih sort, ki uspevajo v Sloveniji, se lahko vključi v širšo oziroma svetovno podatkovno bazo referenčnih oljčnih sort. Natančne analize sort so ključnega pomena za vzpostavitev uporabnosti profilov markerjev, ki jih zbirajo različni laboratoriji za namene identifikacije sort in splošne genetske študije oljk. Te podatkovne baze se lahko uporabljajo tudi za identifikacijo sort neznanih vzorcev, za identifikacijo sinonimov in homonimov med pridelovalnimi območji ter študije geografskega izvora določenih sort.

ANG

The olive is one of the most ancient cultivated fruit tree and oil producing crop of the Mediterranean basin with a very high historical, cultural and economic relevance and it also plays a fundamental role in landscape maintenance of some regions. Olive production is globally the most important agricultural branch and olive oil is the principal source of fats in the wealthy Mediterranean diet. Despite its major socioeconomically relevance and the health-giving benefits related to olive consumption, research on olive tree genetics remain insufficient to highlight the evolution, the function and the structure of its genome compared to other Mediterranean crops and fruit trees. Furthermore, the genetic improvement and breeding of olive tree is hindered mainly due to the long juvenile period after the crossing varieties, auto fertility of some varieties, and maintenance of varieties by vegetative propagation. As a result, limited or no information on inheritance of agronomical important properties is available. For olive genetic resources improvement, is therefore an urgent need to characterize and evaluate existing biodiversity and to identify the most appropriate genotypes for cultivation in defining region.

The research of national olive genetic patrimony with DNA markers and implementation of results into international frameworks will significantly contribute to the knowledge of economic value of olive varieties and to extent of diversity of this species. Identification and evaluation of local varieties, which are well adapted to the ecological factors of particular environment, are thus the first step towards the improvement of olive genetic resources.

The constructed database which contains genotyping data for olive varieties grown in Slovenia can be introduced into wider or world reference olive database. Detailed analysis are important for establishment the fundamental utility of marker profiles collected from different laboratories for the purpose of variety identification and general olive genetic studies. These databases can be also used for variety identification of unknown samples, for identification of synonyms and homonyms between different growing regions, and for study geographical origin of specific varieties.

11.2. Pomen za razvoj Slovenije¹²

SLO

Rezultati projekta so pomembni tako za promocijo države, kot tudi za izobraževanje kadrov. Oljka je glede na površino gojenja v Sloveniji na drugem mestu, za jablano. Na podlagi geografske lege, podnebni značilnosti in sorte strukture, je Slovenija uvedla zaščiteno označbo porekla (ZOP) »Ekstra deviško oljčno olje Slovenske Istre« (EDOOSI ZOP). Leta 2007 ga je tudi EU priznala kot prvi slovenski proizvod, ki nosi tovrstno označbo. Raziskava oljk na nacionalni ravni in predstavljanje rezultatov v mednarodni raziskovalni skupnosti bosta bistveno prispevala k promociji Slovenije kot sredozemske države in bosta omogočila enakopravno vključevanje slovenskih raziskovalcev v mednarodno znanstveno sfero. Za slovenske

raziskovalne skupine je izrednega pomena vzpostavitev mednarodnega sodelovanja med raziskovalnimi ustanovami, zaradi raziskovanja sredozemskih sadnih vrst in zaradi opredelitve skupnih ciljev. Mednarodno sodelovanje bo omogočilo pretok informacij, mednarodno izmenjavo raziskovalcev, prenos znanja in izkušenj med partnerji na področju sredozemskega kmetijstva in izmenjavo rastlinskega materiala med partnerji.

Oljkarstvo ponuja možnost za razvoj kakovostnih in tipičnih proizvodov, ki prispevajo k večji prepoznavnosti sredozemskega območja v Sloveniji in hkrati k večji konkurenčnosti proizvajalcev na skupnem evropskem trgu. Konkurenčnost proizvajalcev je izrednega pomena za ohranjanje poseljenosti podeželja, za ustvarjanje novih delovnih mest in preprečuje mlajšim generacijam odhod s podeželja in usmerjanje v gospodarsko bolj dobičkonosne aktivnosti. Kar zadeva socialno-ekonomskega razvoja, je uvedba tipičnih proizvodov in tradicionalnih praks kmetovanja zelo pomembna za izboljšanje kmetijske panoge.

Rezultati projekta so prispevali k poznavanju genetskega materiala oljk, ki je prisoten v regiji in so razjasnili obseg diverzitete oljk, ki uspevajo v slovenskih oljčnih nasadih. Izjemna oljčna diverziteta, ki je bila odkrita v študiji, bo v prihodnosti služila kot osnova za razvoj strategije za ohranitev in vrednotenje oljčnih genskih virov na nacionalnem nivoju. Slednje je izjemnega pomena za preprečevanje genetske erozije oljk v Sloveniji. Na področju upravljanje genskih virov sta bili z markerji DNA pregledani dve nacionalni kolekciji oljk in identificirane so bile vse napačne označitve sadilnih mest, kar je pomembno s stališča preprečevanja napačnega vrednotenja oljčnih genskih virov. Rezultati projekta so razjasnili tudi identifikacijo oljčnih sort, ki uspevajo v slovenski Istri in v Goriških Brdih in potrdili obstoj homonimov pri določenih sortah. Študija samoinkompatibilnosti glavne oljčne sorte 'Istrska belica', ki je vključevala starševski test embrijev, je potrdila, da je sorta največkrat oplojena z drugimi sortami. Vsi ti rezultati bodo pomembno prispevali k razvoju strategije za upravljanje genskih virov oljk v Sloveniji.

ANG

The project results are important for the promotion of the country as well as for the education of human resources. In Slovenia the olive-tree is second to the apple-tree with regard to the area being used for its cultivation. On the basis of geographic location, climatic conditions and varietal selection, Slovenia introduced the protected designation of origin (PDO) "Extra virgin olive oil of Slovene Istria" (EDOOSI ZOP). In 2007, the EU recognized it as the first Slovene product bearing such a designation. Thus research on olives on national level and introduction of results into international research community will significantly contribute to the promotion of Slovenia as a Mediterranean country and will also allow the equal inclusion of Slovenian researchers into international scientific sphere. Establishment of international cooperation between research institutions conducting research of Mediterranean fruit species and defining the common goals is of great importance for Slovenian research groups. International cooperation will facilitate information flow, international mobility of researchers, know-how transfer between partners on the Mediterranean agriculture area, exchange of plant material between partners.

Olive growing offers the opportunity for the development of quality and typical products which contribute to the greater visibility of the Mediterranean region in Slovenia as well as to greater competitiveness of producers on the common European market. This latter fact is important for the preservation of the settlement of rural areas, for job creation as well as for deterring the young generations from leaving the farms and undertaking economically more profitable activities. As regards the socio-economic development, the introduction of typical products and traditional farming practices is relevant for the improvement of agricultural structure.

Results of the project contributed to the knowledge of olive genetic material present in the region and clarified the extent of diversity of olives grown in Slovenian olive orchards. The great olive diversity observed in this study will serve as the base for development of future strategy for preservation and evaluation of olive genetic resources on national level. This is very important for preventing genetic erosion of olive genotypes in Slovenia. In the field of olive germplasm management, two national collections have been screened by DNA markers and all mislabeling of planting sites have been identified. This is important to prevent incorrect evaluation of olive genetic resources. Results of the project also clarified the identity of olive varieties grown in Slovene Istria and Goriška Brda and confirmed the existence of homonyms in some varieties. Investigation of self-compatibility of the main olive variety 'Istrska belica' in Slovenia which included the paternity test of embryos, confirmed that this variety is highly fertilized by other varieties. All these results will significantly contribute to the development of strategy for management of olive genetic resources in Slovenia.

12.Vpetost raziskovalnih rezultatov projektne skupine.

12.1.Vpetost raziskave v domače okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- v domačih znanstvenih krogih
- pri domačih uporabnikih

Kdo (poleg sofinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?¹³

Rezultate bo koristil PCO kot kurator obeh nacionalnih kolekcij oljk in je zaradi težav pri upravljanju kolekcij želel opraviti še profiliranje sort z markerji DNA. Pravilna identifikacija bo omogočala pridobivanje relevantnih rezultatov agronomskega vrednotenja sort. Direktni uporabniki rezultatov so še KSS, ki pridelovalcem svetuje izbiro sort in oprasovalcev v oljčnikih. Interes po rezultatih izražajo tudi pridelovalci, ki skrbijo za ohranjanje avtohtonega slovenskih oljčnih sort.

12.2.Vpetost raziskave v tuje okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- v mednarodnih znanstvenih krogih
- pri mednarodnih uporabnikih

Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujini raziskovalnimi inštitucijami:¹⁴

Raziskovalna skupina tesno sodeluje z:
-INRA, Montpellier, Francija; sodelovanje poteka v okviru bilateralnih projektov.
-Biotehniška fakulteta, Univerze v Črni Gori; izmenjava raziskovalcev, sodelovanja na nacionalnih in mednarodnih projektih ter mentorstvo,
- Inštitut za jadranske kulture in melioracije krasa, Split, Hrvaška, sodelovanje na področju oljkarstva in sredozemskih kultur; projekti in mednarodne objave.

Kateri so rezultati tovrstnega sodelovanja:¹⁵

Rezultati znanstvenega sodelovanja z INRA Montpellier so skupne objave na področju genomike oljke (Genomic and EST microsatellite loci development and use in Olive: Molecular tools for genetic mapping and association studies, Essalouh et al., 2012, v tisku) in diverzitate fig (Bandelj et al.; publikacija v pripravi). Sodelovanje z Univerzo v Črni Gori temelji na izvajanju bilateralnega projekta na oljkah in nacionalnega projekta v Črni gori, v katerega je kot aktivna raziskovalka vključena Dunja Bandelj slovenske raziskovalne skupine. Dunja Bandelj je tudi mentorica doktorski študentki iz črnogorske raziskovalne skupine, ki pripravlja disertacijo na področju molekularne analize oljk iz Črne Gore. Skupini že imata dokumentirano skupno mednarodno objav (COBISS.SI-ID 1628627). Rezultate sodelovanja z inštitutom iz Splita potrjujejo skupne mednarodne objave na področju diverzitet oljk (1995219, 6300281, 1586899) in fig (1628627).

C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja in obdelavo teh podatkov za evidence ARRS
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki
- so z vsebino letnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta
- bomo sofinancerjem istočasno z zaključnim poročilom predložili tudi študijo ali elaborat, skladno z zahtevami sofinancerjev

Podpisi:

*zastopnik oz. pooblaščen oseba
raziskovalne organizacije:*

in

vodja raziskovalnega projekta:

Univerza na Primorskem,
Znanstveno-raziskovalno središče
Koper Università del Litorale Centro
di ricerche scientifiche di Capodistria

Dunja Bandelj

ŽIG

Kraj in datum:

Koper	5.10.2012
-------	-----------

Oznaka prijave: ARRS-CRP-ZP-2012-05/1

¹ Zaradi spremembe klasifikacije je potrebno v poročilu opredeliti raziskovalno področje po novi klasifikaciji FOS 2007 (Fields of Science). Prevajalna tabela med raziskovalnimi področji po klasifikaciji ARRS ter po klasifikaciji FOS 2007 (Fields of Science) s kategorijami WOS (Web of Science) kot podpodročji je dostopna na spletni strani agencije (<http://www.arrs.gov.si/si/gradivo/sifranti/preslik-vpp-fos-wos.asp>). [Nazaj](#)

² Podpisano izjavo sofinancerja/sofinancerjev, s katero potrjuje/jo, da delo na projektu potekalo skladno s programom, skupaj z vsebinsko obrazložitvijo o potencialnih učinkih rezultatov projekta obvezno priložite obrazcu kot priponko (v skeniranem PDF formatu) in jo v primeru, da poročilo ni polno digitalno podpisano, pošljite po pošti na Javno agencijo za raziskovalno dejavnost RS. [Nazaj](#)

³ Napišite povzetek raziskovalnega projekta (največ 3.000 znakov v slovenskem in angleškem jeziku) [Nazaj](#)

⁴ Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega projekta in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁵ Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikosti pisave 11) [Nazaj](#)

⁶ V primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega projekta oziroma v primeru sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine v zadnjem letu izvajanja projekta (obrazložitev). V primeru, da sprememb ni bilo, to navedite. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁷ Znanstveni in družbeno-ekonomski dosežki v programu in projektu so lahko enaki, saj se projektna vsebina praviloma nanaša na širšo problematiko raziskovalnega programa, zato pričakujemo, da bo večina izjemnih dosežkov raziskovalnih programov dokumentirana tudi med izjemnimi dosežki različnih raziskovalnih projektov.

Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'. [Nazaj](#)

⁸ Znanstveni in družbeno-ekonomski dosežki v programu in projektu so lahko enaki, saj se projektna vsebina praviloma nanaša na širšo problematiko raziskovalnega programa, zato pričakujemo, da bo večina izjemnih dosežkov raziskovalnih programov dokumentirana tudi med izjemnimi dosežki različnih raziskovalnih projektov.

Družbeno-ekonomski rezultat iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'.

Družbenoekonomski dosežek je po svoji strukturi drugačen, kot znanstveni dosežek. Povzetek znanstvenega dosežka je praviloma povzetek bibliografske enote (članka, knjige), v kateri je dosežek objavljen.

Povzetek družbeno ekonomsko relevantnega dosežka praviloma ni povzetek bibliografske enote, ki ta dosežek dokumentira, ker je dosežek sklop več rezultatov raziskovanja, ki je lahko dokumentiran v različnih bibliografskih enotah. COBISS ID zato ni enoznačen izjemoma pa ga lahko tudi ni (npr. v preteklem letu vodja meni, da je izjemen dosežek to, da sta se dva mlajša sodelavca zaposlila v gospodarstvu na pomembnih raziskovalnih nalogah, ali ustanovila svoje podjetje, ki je rezultat prejšnjega dela ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)

⁹ Navedite rezultate raziskovalnega projekta iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) v primeru,

Zaključno poročilo o rezultatih ciljnega raziskovalnega projekta - 2012

da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 7 in 8 (npr. ker se ga v sistemu COBISS ne vodi). Največ 2.000 znakov vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹⁰ Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen projekt, ki je predmet poročanja [Nazaj](#)

¹¹ Največ 4.000 znakov vključno s presledki [Nazaj](#)

¹² Največ 4.000 znakov vključno s presledki [Nazaj](#)

¹³ Največ 500 znakov vključno s presledki (velikosti pisave 11) [Nazaj](#)

¹⁴ Največ 500 znakov vključno s presledki (velikosti pisave 11) [Nazaj](#)

¹⁵ Največ 1.000 znakov vključno s presledki (velikosti pisave 11) [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-CRP-ZP/2012-05 v1.00c

ED-A3-92-2D-3D-94-46-F9-25-92-7F-E8-F6-18-35-B5-C1-7A-1F-2D

Determinacija in vrednotenje genskih virov oljk v
nacionalnih kolekcijah Slovenije z uporabo
markerjev DNA

Dunja Bandelj, Alenka Arbeiter, Milena Bučar-Miklavčič

2012



Univerza na Primorskem, Znanstveno-
raziskovalno središče
Garibaldijeva 1, 6000 Koper
Tel.: 05 6637700
Faks.: 05 6637710

Zaključno poročilo projekta št. V4-1056

Projekt financira Ministrstvo za kmetijstvo in okolje RS in Javna
agencija za raziskovalno dejavnost RS.

Povzetek projekta:

V Sloveniji se je sortna struktura oljk v 20. stoletju močno spremenila. Mnoge sorte, ki so se stoletja gojile na območju Slovenske Istre iz oljčnikov izginjajo. Da bi preprečili izgubo dragocenih ekotipov oljk, ki predstavljajo nacionalni genski bazen, se je v Sloveniji v letu 1998 pričelo z inventarizacijo sort na terenu. Številna oljčna drevesa s posebnimi morfološki lastnostmi so bila evidentirana in zbrana v dveh nacionalnih kolekcijskih nasadih v Strunjanu in Purisimi. V kolekcijah poteka agronomsko vrednotenje sort, klonov, ekotipov in neznanih genotipov. Identifikacija sort na osnovi morfoloških karakteristik je problematična zaradi prisotnosti sinonimov, homonimov ter odsotnosti standardov, na katere bi nedeterminirane sorte primerjali. Morfološki znaki so tudi odvisni od vpliva okoljskih dejavnikov ter izvajanja agronomskih tehnologij.

Pri upravljanju kolekcij pogosto pride do zamenjave sadilnega materiala in sadilnih mest, zato je pregled kolekcije z metodami, ki omogočajo nedvoumno identifikacijo nujen, da bi preprečili napačno vrednotenje zbranih genotipov. V Sloveniji kolekcije oljk še niso bile ustrezno pregledane, čeprav je to običajen pristop pri upravljanju kolekcij. V Sloveniji gojimo oljko v Istri in v Brdih in med pridelovalci prevladuje mnenje, da so določene sorte prisotne le v Brdih, druge pa samo v Istri, a primerjalna študija o diverziteti ali identičnosti istoimenskih sort z markerji DNA še ni bila opravljena. Vodilna sorta v Sloveniji je 'Istrska belica', ki predstavlja kar s 70 % vseh oljčnih dreves. Pridelovalci opozarjajo, da obstajajo problemi z rodnostjo te sorte, zato projekt predvideva z mikrosatelitskimi markerji določiti najpogostejše opraševalce 'Istrske belice'. Na področju kemometričnega vrednotenja oljčnih sort in olja v Sloveniji so bili uporabljeni različni pristopi, metode in laboratorijska oprema, zato projekt predvideva harmonizacijo rezultatov med inštitucijami.

Z razvojem DNA markerskih sistemov so na voljo številne različne tehnike, ki jih lahko uporabimo za študije diverzitete, forenzične študije ter druge aplikacije v kmetijstvu. Projekt vključuje uporabo modernih biotehnoloških pristopov in orodij ter molekularno genetiko za reševanje aktualne problematike oljkarstva v Sloveniji. Cilji projekta so: 1) determinacija neznanih genotipov oljk z markerji DNA, ki so bili predhodno odkriti z inventarizacijo na terenu ter morfološko opisani; 2) uvedba markerjev DNA v upravljanje kolekcij oljk s pregledom in identifikacijo sadilnih mest oljk v nacionalnih kolekcijskih nasadih Strunjan in Purisima; 3) primerjava genetskih - DNA profilov tradicionalnih sort pridelovalnih območij Slovenske Istre in Brd za ugotavljanje diverzitete ali identičnosti gojenih sort med območjema; 4) izdelava starševskega testa z mikrosatelitskimi markerji za določitev optimalnih opraševalcev sorte 'Istrska belica' in ugotovitev kompatibilnosti sort; 5) nadgradnja podatkov oljčnih sort z morfološki in kemijski profili (kemometrična obdelava). Rezultati projekta bodo služili kot osnova za razvoj strategije za nacionalno upravljanje z genskimi viri oljk v Sloveniji.

Project summary

In Slovenia, the structure of olive variety in the 20th century has been changed significantly. Many varieties that have been grown for centuries in the Slovenian Istria are disappearing from the olive orchards. In order to prevent the loss of valuable olive ecotypes which represent a national gene pool, the inventory of varieties in the field was started in 1998. Many olive trees showing specific morphological characteristics were collected and planted in two national collections in Strunjan and Purisima. In collections agronomic evaluation of varieties, clones, ecotypes and unknown genotypes is performed. Identification of varieties based on morphological characters is problematic due to the presence of synonyms, homonyms, and absence of standards on which undetermined varieties can be compared. Morphological characters are also influenced by environmental factors and used agronomic technologies.

During the management of collections, planting material and sites are often mixed, thus the screening of collections by methods that allow unambiguous identification of planted material is necessary to prevent wrong evaluation of collected genotypes. In Slovenia, olive collections have not been appropriately examined yet, although this is a traditional approach in the management of collections.

In Slovenia olives grow in the region of Istria and Brda. According to growers opinion, define varieties are presented only in Brda growing region, and others are prevailing in Istria. A comparative study of diversity or identity of varieties with the same name and with use of DNA markers has not been carried out yet. The leading variety in Slovenia is 'Istrska belica', which represents 70 % of all olive trees. Growers have noted that there are problems with fertility of this variety, so the project plans the determination of the most common pollinators of 'Istrska belica' with microsatellite markers. In the field of the chemometric evaluation of olive varieties and olive oil, different approaches, methods and laboratory equipment have been used in Slovenia, and the project aims to harmonize results between institutions.

With development of DNA marker systems, many different techniques for diversity, forensic studies and other applications in agriculture are available. The project includes the use of modern biotechnological approaches and tools and molecular genetics for solving actual problems in olive growing in Slovenia.

The aims of the project are: 1) to determine unknown olive genotypes that were previously discovered in the field and morphologically described by use of DNA markers; 2) to introduce the use of DNA markers for olive collections management by reviewing and identifying olive planting sites in national collections Strunjan and Purisima; 3) to compare genetic – DNA profiles of traditional varieties growing in Slovenian Istria and Brda in order to determine the diversity and identity of the cultivated varieties between regions; 4) to perform the paternity analysis by microsatellite markers in order to determine optimal pollinators of 'Istrska belica' and to establish the compatibility of varieties; 5) to upgrade the data of olive varieties with morphological and chemical profiles (chemometric analysis). Results of the project will be base for development of the strategy for national management of olive genetic resources in Slovenia.

Delovni sklop 1: *Determinacija neznanih genotipov oljk z markerji DNA, ki so bili predhodno odkriti z inventarizacijo na terenu in morfološko opisani*

NAMEN RAZISKAVE

V Sloveniji se oljkarstvo sooča z gensko erozijo, ki se kaže v izgubi genotipov oljk, ki so bili prisotni po drugi svetovni vojni. Z namenom, da bi preprečili izgubo dragocenih genotipov, ki so s stališča žlahtnjenja oljke lahko nosilci odpornostnih genov ter predstavljajo nacionalni genski bazen, se je v Sloveniji v letu 1998 pričelo z inventarizacijo sort na terenu. Od pričetka inventarizacije je bilo na terenu evidentiranih in morfološko opisanih 169 dreves različnih sort oljk, katerih identiteta sort še ni bila potrjena z molekulsko karakterizacijo. Zbrani fenotipi so bili morfološko opisani, opravljene so bile tudi določene kemijske analize oljčnega olja, ni pa še bila opravljena molekulska karakterizacija. S tem delovnim sklopom smo želeli skleniti desetletne raziskave genskih virov oljk v Sloveniji z dopolnitvijo obstoječe podatkovne baze z izdelavo genetskih DNA profilov.

MATERIAL IN METODE

V analizo smo vključili skupno 104 drevesa neznanih genotipov oljk, od tega 83 dreves iz Slovenske Istre in 21 dreves iz Goriških Brd. Za determinacijo neznanih genotipov oljk smo uporabili 33 referenčnih sort, ki so zbrane v kolekcijskem nasadu Strunjan (v preglednicah oznaka »S-«) in Purisima (v preglednicah oznaka »P-«) in so bile v Delovnem sklopu 2 genotipizirane z markerji DNA (Preglednica 1). Oljčno DNA smo izolirali iz mladih oljčnih listov po uveljavljenem protokolu CTAB (Kump in sod., 1992).

Preglednica 1: Seznam 33 referenčnih sort iz Strunjana in Purisime ter pripadajoče oznake.

Št.	Sorta	Oznaka	Št.	Sorta	Oznaka
1	'Arbequina'	A	18	'Maurino'	M
2	'Ascolana tenera'	At	19	'Mišnica'	Mp/Ms
3	'Athena'	Ah	20	'Moraiolo'	Mo
4	'Belica Pucer'	Bp	21	'Nocellara del Belice'	Nb
5	'Buga'	Bu	22	'Oblica'	O
6	'Debeli rtič (Cucco?)'	Dc	23	'Pendolino'	P
7	'Debeli rtič (Santa Caterina?)'	Ds	24	'Picholine'	Pi
8	'Cipressino'	C	25	'Planjave'	Pl
9	'Coratina'	Co	26	'Rozi'	R
10	'Črnica'	Č	27	'Samo'	S
11	'Frantoio'	F	28	'Santa Caterina'	Sc
12	'Grignan'	G	29	'Samo Nova vas'	Sn
13	'Itrana'	I	30	'Samo 2 Pobegi'	Sp
14	'Lastovka'	La	31	'Štorta'	Š
15	'Leccino'	L	32	'Zelena'	Ze
16	'Leccione'	Le/Lo	33	'Zelenjak viseča'	Zv
17	'Leccio del corno'	Lc			

Za pomnoževanje oljčne jedrne DNA smo uporabili markerje RAPD (naključno pomnožena polimorfna DNA) in mikrosatelite. Za pomnoževanje naključnih predelov DNA oljčnih sort smo izbrali in uporabili najbolj informativne markerje za ugotavljanje polimorfizma na osnovi naših predhodnih izkušenj ter objavljenih znanstvenih člankov. Odločili smo se za 5 začetnih oligonukleotidov (OPX-03, OPX-08, OPX-11, OPA-01 in OPA-08). Pomnoževanje markerjev RAPD je potekalo po protokolu Šuštar-Vozlič in Javornik (1999) v cikličnem termostatu DNA Thermal Cycler 480. Za ločevanje pomnoženih markerjev RAPD smo uporabili agarozno elektroforezo. Vizualizacija fragmentov DNA je potekala s pomočjo etidijevega bromida, fotografiranje profilov pa s kamero za gel MiniBis Pro.

V nadaljevanju smo zaradi lažjega vrednotenja v analizo vključili tudi mikrosatelitske lokuse, ki smo jih izbrali na osnovi naših predhodnih izkušenj ter objavljenih znanstvenih člankov. Za analizo mikrosatelitskega polimorfizma smo uporabili 7 lokusov: DCA3, DCA9, DCA11, DCA16 (Sefc in sod., 2000), UDO-019 (Cipriani in sod., 2002), EMO-3 (De la Rosa in sod., 2002) in GAPU101 (Carriero in sod., 2002). Reakcija PCR je potekala v skupnem volumnu 15 μ l in je bila sestavljena iz 1 \times PCR reakcijskega pufra (Promega, Manheim, Nemčija) [10 mM Tris-HCl (pH 8,3 na 20 $^{\circ}$ C); 1,5 mM MgCl₂; 50 mM KCl], 0,2 mM dNTP (Sigma-ALDRICH, St. Louis, ZDA), 0,2 μ M koncentracije vsakega začetnega oligonukleotida, 0,25 μ M koncentracije univerzalnega M13 (-21) začetnega oligonukleotida, označenega s fluorescentno molekulo FAM, VIC, PET ali NED (Applied Biosystems), 0,375 enote encima Taq DNA polimeraze (Promega, Manheim, Nemčija) in 20 ng DNA oljke. Reakcija PCR je potekala v cikličnem termostatu 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) po naslednjem temperaturnem profilu: začetna 5 min denaturacija DNA na 94 $^{\circ}$ C, 5 ciklov s ponavljanjem (45 s na 94 $^{\circ}$ C, 30 s na 57 $^{\circ}$ C, 30 s na 72 $^{\circ}$ C), kjer se je pri vsakem ciklu temperatura pri drugem koraku znižala za 1 $^{\circ}$ C, 25 ciklov s ponavljanjem (30 s na 94 $^{\circ}$ C, 30 s na 52 $^{\circ}$ C in 1 min 30 s na 72 $^{\circ}$ C) ter končna 8 min inkubacija vzorcev na 72 $^{\circ}$ C.

Za ločevanje pomnoženih markerjev smo uporabili avtomatski sekvenator ABI Prism 3130 (Applied Biosystems) in podatke analize uvozili v programski paket Gene Mapper 4.1 (Applied Biosystems).

REZULTATI IN RAZPRAVA

V analizo je bilo vključenih manj vzorcev kot je bilo prvotno načrtovanih v projektu. Od 169 načrtovanih, je bilo analiziranih 104 dreves. Razlika v številu je bila zaradi tega, ker določena drevesa na terenu niso več dostopna.

Pomnoževanje je bilo uspešno z markerji RAPD in mikrosateliti. Profile neznanih genotipov na terenu smo primerjali s profili DNA referenčnih sort iz kolekcije v Strunjanu in na Purisimi (33 referenčnih sort). Od 104 neznanih genotipov iz Slovenske Istre in Goriških Brd smo popolno identifikacijo lahko določili pri 61 drevesih (58,7 % analiziranih dreves), pri 7 (6,7 %) drevesih, ki so v preglednici 2 krepko označena, smo ugotovili domnevno identifikacijo (razlike obstajajo na določenih lokusih), pri 36 drevesih (34,6 %) pa smo ugotovili, da genetski profili ne pripadajo nobeni referenčni sorti, kar pomeni, da v Sloveniji za te genotipe nimamo standardov (Preglednica 2). Pri teh 36 drevesih smo ugotovili, da gre dejansko za 29 različnih genotipov.

Determinacija in vrednotenje genskih virov oljk v nacionalnih kolekcijah Slovenije z uporabo markerjev DNA

Preglednica 2: Seznam neznanih genotipov oljk, vzorčenih v Slovenski Istri in Goriških Brdih ter domnevne sorte. Referenčne sorte iz Strunjana so označene s črko »S-«, iz Purisime pa s »P-«. Krepko označeni vzorci so bili domnevno identificirani. Oznaka '/' pomeni, da profil DNA ne ustreza nobeni referenčni sorti.

Slovenska Istra	OZNAKA	Domnevna sorta
1 FONDA 1 (nad figo desno)	1	/
2 FONDA 2 (MATA) (pod cesto)	2	/
3 FONDA 3 (nad figo levo)	3	S-Bu
4 ZMAREL FONDA (2. izolacija)	4	/
5 DROBNICA LAMA	5	P-Mp4
6 CIPER 3(terasa)/11(drevo) (3/3/11)	6	/
7 OBLICA LAMA	7	S-Sn
8 SICILJANKA LAMA (4/3/22) (le 3 cepiči, ne celo drevo)	8	/
9 PIRANSKA ROSSIGNOLA(LAMA) (4/3/9)	9	/
10 PICUAL LAMA 1(terasa)/4(vrsta)/11(drevo)	10	/
11 MATA LAMA	11	S-S
12 DROBNA Da	12	S-Bu
13 ČRNICA STARA Da	13	/
14 BUGA STARA Da	14	S-Bu
15 STRUNJAN 1	15	/
16 STRUNJAN 2	16	/
17 STRUNJAN 3	17	/
18 STRUNJAN 4	18	/
19 STRUNJAN 6	19	/
20 STRUNJAN 7	20	/
21 STRUNJAN 8	21	S-L
22 STRUNJAN 9	22	/
23 STRUNJAN 10	23	S-Bp
24 STRUNJAN 11	24	/
25 STRUNJAN 13	25	/
26 STRUNJAN 14	26	/
27 STRUNJAN 15	27	S-Mo
28 STRUNJAN 16	28	/
29 STRUNJAN 17	29	/
30 STRUNJAN 18	30	/
31 STRUNJAN 19	31	/
32 DROBNICA AMBROŽIČ 3/6 (prva polovica drevesa)	32	/
33 BUGA AMBROŽIČ 4/5. drevo	33	/
34 MIŠNICA SV.PETER	34	S-Bu
35 MIŠNICA SV.PETER (zraven fige)	35	S-M
36 MIŠNICA SV.PETER (3.drevo.-2)	36	/
37 BUGA 1 SV.PETER	37	S-Bu

Determinacija in vrednotenje genskih virov oljk v nacionalnih kolekcijah Slovenije z uporabo markerjev DNA

38	BUGA SV.PETER (pod Buga 1, prvi od vasi)	38	/
39	PUČE 1 (ob cesti)	39	S-Bp
40	PUČE 1 (zamaknjena)	40	S-Sn
41	ČRNICA MLADEN	41	S-Č
42	PLANJAVE 1	42	P-PI
43	PADNA 1	43	P-Ms
44	ČRNICA 1 PADNA (2.drevo pod zidom s ceste)	44	S-Č
45	MIŠNICA PIŠTAN (2.drevo/3.vrsta-od leve Buge)	45	S-Sn
46	Tb 7/2	Dr22	S-C
47	N 7/9	Dr23	S-I
48	N? 17/31	Dr24	P-Ds
49	N1 15/20	Dr25	S-Lc
50	K 13/20	Dr26	P-Dc
51	Sc 13/3	Dr27	P-Ds
52	Bu? 2-3/2 (med 2. in 3. korono)	Vd28	/
53	Mo? 3/15 (debeli, črni plodovi)	Vd29	/
54	Ž 1-2 (med 1. in 2. korono)	Vd30	/
55	Le 2/18	Vd31	/
56	Bu? 1. terasa/2. vrsta/3. drevo	Vd32	S-Bu
57	Bu? 1. terasa/2. vrsta/4. drevo	Vd33	S-Bu
58	Bu? 2-3/2	Vd34	P-Ms
59	Tu 0 (1.terasa nad zidom-skoraj na koncu)	Vd35	S-Bu
60	A 8/12	Be36	S-A
61	Rd 9/9	Be37	S-Bu
62	C 9/7	Be38	S-C
63	Nb 9/3	Be39	S-Nb
64	At 6/2	Be40	P-At
65	F 6/6	Be41	S-F
66	O 6/7	Be42	P-PI
67	Zv 2/5	Be43	S-Zv
68	Ps 1/8	Be44	S-P
69	Korona	Be45	/
70	Ah 1/16	Be46	S-Mo
71	L 4/17	Be47	S-L
72	Ms 6/19	Be48	S-M
73	D 7/19	Be49	/
74	Le 7/16	Be50	S-Lo
75	Pi 10/18	Be51	S-Pi
76	Al 10/6	Be52	P-Ms
77	I 8/9	Be53	S-I
78	Lc 13/6	Be54	S-Lc
79	Al 13/1	Be55	P-Ms
80	Z 19/14	Be56	S-Co
81	L 20/17	Be57	S-L
82	Sc 9/10	Be58	S-Sc

Determinacija in vrednotenje genskih virov oljk v nacionalnih kolekcijah Slovenije z uporabo markerjev DNA

83	Š 6/17	Be59	S-Š
	Goriška Brda	OZNAKA	Domnevna sorta
84	Briška črnica	GB-Č1	S-Bu
85	"Koprška" črnica (pognala iz podlage)	GB-Č2	P-O
86	Belica (razmnožujejo jo v Veroni)	GB-B3	S-Bp
87	Maurino	GB-M4	S-M
88	Štorta	GB-Š5	S-Š
89	Ascolana	GB-At6	S-At
90	Leccino	GB-L7	S-L
91	Pendolino	GB-P8	S-P
92	Belica (iz Purissime)	GB-B9	S-Bp
93	Belica cepljena na črnico	GB-B10	S-Bp
94	Leccino ali Leccione?	L/Lo11	S-L
95	Briška drobnica	GB-D12	P-Ms
96	Cipressino?	GB-C13	/
97	"stara sorta", ki je preživela pozebo 1929	Gb14	P-Mp
98	Oblica (Pelješac)	GB-O15	P-O
99	Buga	GB-Bu16	/
100	Briška črnica (2. drevo v vrsti-preživela pozebo 1929)	GB-Č17	S-Bu
101	Briška črnica (3. drevo v vrsti)	GB-Č18	S-Bu
102	Cipressino (2. vrsta, 1. drevo)	GB-C19	/
103	Cipressino (4. vrsta, v sredini)	GB-C20	S-C
104	Neznana (3. vrsta, v sredini)	Gb21	/

ZAKLJUČKI

Tako mikrosateliti kot naključno pomnožena polimorfna DNA (RAPD) so primerni markerji za določanje neznanih genotipov. Markerji RAPD omogočajo, da z manj analizami pregledamo večji del genoma, vendar se problematika kaže v ponovljivosti rezultatov in težavah, s katerimi se soočamo pri vrednotenju kompleksnih elektroforegramov. Znotraj laboratorija problemov s ponovljivostjo nismo imeli, vendar smo se pa zaradi lažjega in hitrejšega vrednotenja odločili za prikaz rezultatov z mikrosateliti. Analiza z mikrosateliti je časovno bistveno krajša, bolj objektivna in zato tudi primerljiva med različnimi laboratoriji.

S pomočjo referenčnih sort iz kolekcije v Strunjanu in na Purisimi nismo uspeli popolnoma identificirati vseh v analizo vključenih dreves, kar pomeni, da v Sloveniji za 29 genotipov, ki pripadajo 36-im drevesom, nimamo standardov. Identiteto domnevno identificiranih in neidentificiranih neznanih genotipov, bi v prihodnje morda lahko določili, če bi bila na voljo svetovna podatkovna baza genotipizacije vseh oljčnih sort z mikrosateliti.

PRIPOROČILA

Na osnovi molekulske analize smo odkrili, da na terenu uspeva še 29 različnih genotipov oljk, ki še niso vključene v nacionalne kolekcije, zato bi bilo smiselno te vzorce razmnožiti in posaditi v nacionalno kolekcijo. Le redka drevesa imajo ime sorte, največ pa je takih, ki imajo delovno ime, zato bi se bilo potrebno odločiti kako se bodo poimenovali v kolekciji. Glede na to, da so bile v času morfološkega vrednotenja poimenovane z delovnim imenom, bi predlagali, da tako poimenovanje ostane tudi v bodoče zaradi sledljivosti rezultatov.

Delovni sklop 2: *Uporaba markerjev DNA v upravljanje kolekcij oljk s pregledom in identifikacijo sadilnih mest oljk v nacionalnih kolekcijskih nasadih Strunjan in Purisima*

NAMEN RAZISKAVE

V Sloveniji se vzdržujeta dva nacionalna kolekcijska nasada (Strunjan in Purisima), v katerih uspevajo na terenu zbrane in morfološko opisane oljčne sorte. Oba nasada sta pomembna v kontekstu vzdrževanja nacionalne genske banke oljke. Kurator nasadov je Poskusni center za oljkarstvo, ki deluje v okrilju Kmetijsko-gozdarske zbornice Slovenije – Zavod GO. Nasad v Strunjanu je v zasebni lasti (g. Danilo Markočič, ga. Viljanka Vesel), lastnik nasada na Purisimi pa je gospodarska družba Vinakoper. Oba nasada vzdržuje Ministrstvo za kmetijstvo in okolje v okviru strokovnih nalog v oljkarstvu. V nasadih poteka vrednotenje sort, ocenjevanje agronomskih značilnosti, odpornosti na bolezni in škodljivce, spremljanje rodnosti in kakovosti oljčnega olja. Glavni namen vrednotenja sort je identifikacija superiornih genotipov za slovensko pridelovalno območje.

Med leti 2000 in 2005 je bila v Strunjanu opravljena delna identifikacija z molekulskimi markerji, novejši nasad na Purisimi pa do sedaj še ni bil preverjen z markerji DNA. Problem identifikacije sadilnih mest na Purisimi se je pojavil zaradi pomešanja sadik v času sajenja. Namen delovnega sklopa je preveriti pravilnost opisa sadilnih mest z identifikacijo sort s pomočjo markerskih sistemov RAPD in mikosatelitov v nacionalnih kolekcijskih nasadih Strunjan in Purisima.

MATERIAL IN METODE

Za pridobitev referenčnih profilov posameznih sort smo v sklopu DS2 najprej pričeli z genotipizacijo referenčnih dreves sort, ki uspevajo v kolekciji Strunjan. Za ta namen smo opravili vzorčenje 100 dreves 27 sort. Oljčno DNA smo izolirali iz mladih listov z metodo CTAB po uveljavljenem protokolu (Kump in sod., 1992). Sledila je optimizacija protokola pomnoževanja markerjev RAPD v verižni reakciji s polimerazo. Za pomnoževanje naključnih predelov DNA oljčnih sort smo izbrali in uporabili najbolj informativne markerje za ugotavljanje polimorfizma na osnovi naših predhodnih izkušenj ter objavljenih znanstvenih člankov. Za pomnoževanje naključnih predelov DNA vzorčnih dreves smo uporabili 5 začetnih oligonukleotidov (OPA-01, OPA-08, OPX-03, OPX-08, OPX-11) (Operon Technologies, Alameda, CA, ZDA). Reakcija PCR je potekala v skupnem volumnu 25 μ l. Reakcijska mešanica je bila sestavljena iz 1 \times PCR pufru (Promega, Mannheim, Nemčija) [10 mM Tris-HCl (pH 8,3 na 20^o C); 1,5 mM MgCl₂; 50 mM KCl], 3,5 mM MgCl₂, 0,2 mM koncentracije vsakega deoksinukleotida trifosfata (Sigma-ALDRICH, St. Louis, ZDA), 0,2 μ M koncentracije začetnega oligonukleotida (Operon Technologies, Alameda, CA, ZDA), 0,5 enote encima Taq polimeraze (Promega, Mannheim, Nemčija) in 40 ng DNA oljke. Pomnoževanje naključnih predelov DNA je potekalo po protokolu v cikličnem termostatu DNA-ENGINE Thermal Cycler 200 (Bio-Rad Laboratories, California, ZDA) po naslednjem temperaturnem profilu: začetna 4 minutna denaturacija DNA na 95 $^{\circ}$ C, sledilo je 40 ciklov s ponavljanjem (30 s na 94 $^{\circ}$ C, 30 s na 38 $^{\circ}$ C, 1 min 45 s na 72 $^{\circ}$ C) ter končna 8 min inkubacija vzorcev na 72 $^{\circ}$ C. Za ločevanje pomnožene DNA smo uporabili horizontalno agarozno elektroforezo v 0,5 \times TBE elektroforetskem pufru [44,5 mM Tris, 44,5 mM borna kislina in 1 mM EDTA] v elektroforetski napravi BIO-RAD (BIO-RAD Laboratories, Philadelphia, ZDA). Na agarozni gel SeaKem LE (FMC Bioproducts, Rockland, ZDA) koncentracije 1,4 % smo nanесли 10 μ l mešanice iz reakcije PCR in

nanašalnega barvila [12,5 % (w/v) Ficoll tip 400, 0,2 % (w/v) brom fenol modro]. Na gel smo nanесли tudi 200 ng DNA dolžinskega standarda Gene Ruler™ 100 baznih parov DNA Ladder Plus (Fermentas, Burlington, Canada), ki nam je omogočal določevitev dolžin fragmentov DNA. Elektroforeza je potekala pri 140 V proti pozitivno nabiti elektrodi, dokler brom fenol modro barvilo iz nanašalnega barvila ni pripotovalo približno 1 cm do konca gela. Fragmente DNA smo obarvali z etidijevim bromidom (EtBr), ki smo ga predhodno dodali v agarozni gel v koncentraciji 0,5 µg/ml. Namnožene fragmente smo opazovali na transiluminatorju UVipure (UVITEC, Cambridge, UK) in fotografirali s kamero za gel MiniBis Pro (DNR Bio Imaging System, Jeruzalem, Izrael).

V nadaljevanju pa smo se odločili, da bomo zaradi lažjega vrednotenja v analizo vključili še mikrosatelite. Mikrosatelitske lokuse smo izbrali na osnovi naših predhodnih izkušenj ter objavljenih znanstvenih člankov. Odločili smo se za sedem mikrosatelitskih lokusov: DCA3, DCA9, DCA11, DCA16 (Sefc in sod., 2000), UDO-019 (Cipriani in sod., 2002) in EMO-3 (De la Rosa in sod., 2002) in GAPU101 (Carriero in sod., 2002). Reakcija PCR je potekala v skupnem volumnu 15 µl in je bila sestavljena iz 1×PCR reakcijskega pufra (Promega, Manheim, Nemčija) [10 mM Tris-HCl (pH 8,3 na 20 °C); 1,5 mM MgCl₂; 50 mM KCl], 0,2 mM dNTP (Sigma-ALDRICH, St. Louis, ZDA), 0,2 µM koncentracije vsakega začetnega oligonukleotida, 0,25 µM koncentracije univerzalnega M13 (-21) začetnega oligonukleotida, označenega s fluorescentno molekulo FAM, VIC, PET ali NED (Applied Biosystems), 0,375 enote encima Taq DNA polimeraze (Promega, Manheim, Nemčija) in 20 ng DNA oljke. Reakcija PCR je potekala v cikličnem termostatu 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) po naslednjem temperaturnem profilu: začetna 5 min denaturacija DNA na 94 °C, 5 ciklov s ponavljanjem (45 s na 94 °C, 30 s na 57 °C, 30 s na 72 °C), kjer se je pri vsakem ciklu temperatura pri drugem koraku znižala za 1 °C, 25 ciklov s ponavljanjem (30 s na 94 °C, 30 s na 52 °C oz. na 55 °C le za lokus DCA14 in 1 min 30 s na 72 °C) ter končna 8 min inkubacija vzorcev na 72 °C.

Za ločevanje pomnoženih markerjev smo uporabili avtomatski sekvenator ABI Prism 3130 (Applied Biosystems) in podatke analize uvozili v programski paket Gene Mapper 4.1 (Applied Biosystems). Za obdelavo podatkov smo uporabili statistične programe CERVUS 2.0 (Marshall in sod., 1998), MICROSAT 1.5 (Minch, 1997) in NTSYS 2.02 (Rohlf, 1998). Za izračun genetskih razdalj smo uporabili Jaccardov koeficient podobnosti, za razvrstitev vzorcev v skupine pa metodo UPGMA.



Slika 1: Kolekcijski nasad oljk v Strunjanu.

V kolekcijskem nasadu na Purissimi smo opravili vzorčenje 173 dreves 37 sort in prav tako iz mladih listov z metodo CTAB izolirali DNA. Celotno kolekcijo smo pregledali z markerji RAPD in uporabili enak protokol pomnoževanja v PCR in način detekcije markerjev RAPD kot pri vzorcih iz Strunjana. Tudi v tem primeru smo se odločili, da bomo zaradi lažjega vrednotenja v analizo vključili še mikrosatelite. Uporabili smo enake mikrosatelitske lokuse, protokol namnoževanja v PCR ter način detekcije kot pri vzorcih iz Strunjana.



Slika 2: Kolekcijski nasad oljk Purisima.

REZULTATI IN RAZPRAVA

Kolekcija Strunjan:

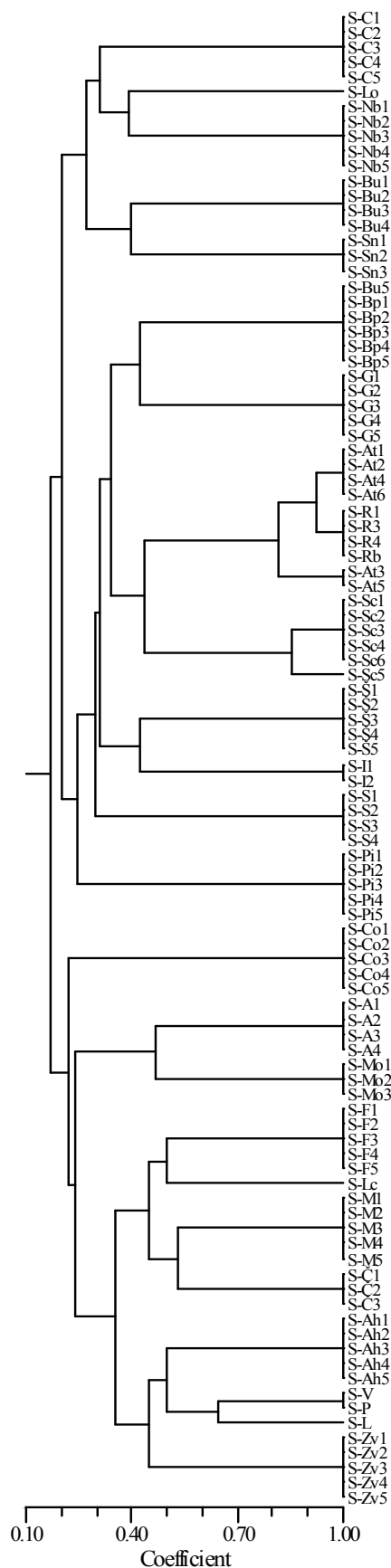
S sedmimi pari lokusno specifičnih začetnih oligonukleotidov smo uspeli identificirati vsa drevesa v kolekcijskem nasadu v Strunjanu. Rezultati so pokazali, da je v kolekciji zbranih 23 sort (Preglednica 3), ki lahko služijo kot referenčne sorte z zanesljivo identifikacijo ('Arbequina', 'Athena', 'Belica Pucer', 'Buga', 'Cipressino', 'Coratina', 'Črnica', 'Frantoio', 'Grignan', 'Itrana', 'Leccino', 'Leccio del corno', 'Leccione', 'Maurino', 'Moraiolo', 'Nocelara del Belice', 'Pendolino', 'Picholine', 'Rozi', 'Samo', 'Samo Nova vas', 'Štorta', 'Zelenjak viseča'). Analiza z mikrosateliti je potrdila, da sta sorti 'Vrba' in 'Pendolino' identični z vsemi analiziranimi lokusi, kar pomeni, da gre za primer sinonimov. Napačno označitev sadilnega mesta smo ugotovili pri sorti 'Buga'. Peto drevo te sorte se je z mikrosateliti izkazalo za sorto 'Belica Pucer'. Pri sorti 'Ascolana tenera' in 'Santa Caterina' smo na lokusu DCA-11 ugotovili dva različna genotipa, kar je lahko posledica mutacij na tem lokusu ali poliklonskega značaja oljk. Običajno so poliklonske sorte oljk starejše gojene populacije, katerih razmnoževanje je potekalo v različnih kolekcijah iz divjih populacij, kar je privedlo do nastanka različnih genotipov (Fontanazza, 1993, cit. po Vergari in sod., 1998). V tem primeru sorti 'Ascolana tenera' in 'Santa Caterina' nista z gotovostjo referenčni. Za potrditev identitete teh dveh sort bi bilo profile DNA potrebno primerjati s profili referenčnih dreves iz svetovne genske banke oljke v Španiji. Z analizo smo razrešili tudi dilemo oznake sadilnega mesta 'Rozi' ali 'Buga', genotipizacija je potrdila identiteto sorte 'Rozi'.

Determinacija in vrednotenje genskih virov oljk v nacionalnih kolekcijah Slovenije z uporabo markerjev DNA

Preglednica 3: Genotipi oljčnih sort v Strunjanu s sedmimi mikrosatelitskimi lokusi (dolžine alelov v bp).

Sorta	DCA-9	DCA-16	DCA-3	DCA-11	UDO-99	EMO-3	GAPU-101
'Arbequina'	201:223	141:165	246:258	163:201	148:173	232:232	204:225
'Athena'	180:199	168:192	258:268	153:163	116:185	226:232	204:219
'Belica Pucer'	211:211	143:189	254:264	163:183	116:148	230:232	212:236
'Buga'	211:223	168:192	254:264	163:199	148:162	223:228	210:236
'Cipressino'	180:204	168:168	256:256	148:163	148:162	228:232	212:225
'Coratina'	199:211	168:190	254:258	153:193	148:148	230:232	217:236
'Črnica'	199:211	174:192	252:268	153:163	148:185	232:232	204:210
'Frantoio'	199:223	168:174	252:258	153:201	148:185	232:232	204:217
'Grignan'	211:227	143:172	254:264	163:183	148:162	223:230	210:219
'Itrana'	199:211	141:143	254:264	169:201	148:185	230:232	204:219
'Leccino'	180:223	168:192	258:268	153:201	116:185	228:232	217:219
'Leccio del corno'	199:223	165:174	252:268	153:163	148:185	228:232	217:219
'Leccione'	180:199	168:168	258:258	153:201	148:185	228:232	210:215
'Maurino'	223:223	168:190	252:268	153:163	148:185	226:232	204:210
'Moraiole'	201:223	168:168	246:258	163:197	148:148	232:236	212:225
'Nocelara del Belice'	180:190	168:192	258:264	169:201	148:148	228:232	219:225
'Pendolino'	180:223	168:190	258:268	163:197	116:185	228:232	217:219
'Picholine'	211:211	165:192	246:268	153:201	148:148	230:230	219:225
'Rozi'	211:217	143:172	246:264	183:201	148:148	223:228	217:219
'Samo'	180:221	143:172	246:268	163:201	148:148	230:232	217:236
'Samo Nova vas'	180:221	168:192	254:268	183:201	148:162	228:232	210:236
'Štorta'	211:221	143:174	252:264	163:201	148:162	232:232	204:219
'Zelenjak viseča'	180:223	165:174	258:268	163:201	116:148	226:232	204:219

Iz podatkov prisotnosti (1) ali odsotnosti (0) določenega alela pri posamezni sorti smo sestavili binarno matriko, ki smo jo uporabili kot osnovo za izračunavanje Jaccardovih koeficientov podobnosti. Za razvrščanje sort v sorodnostne skupine smo uporabili metodo UPGMA (Slika 3).



Slika 3: Dendrogram UPGMA narejen na osnovi mikrosatelitskih podatkov in Jaccardovih koeficientov genetske podobnosti med 27 sortami oz. tipi oljk v Strunjanu.

Determinacija in vrednotenje genskih virov oljk v nacionalnih kolekcijah Slovenije z uporabo markerjev DNA

Iz dendrograma je razvidno, da so se sorte razvrstile v dve večji skupini. Prva skupina je glede na geografski izvor zelo heterogena. Znotraj prve skupine se jasno loči manjša samostojna podskupina, kjer so bil ugotovljeni višji koeficienti podobnosti (0,85; 0,86; 0,92), vanjo pa so se razvrstile sorte oljk z debelimi plodovi, kar nakazuje na določen selekcijski pritisk. Drugo večjo skupino predstavljajo vodilne sorte iz osrednje Italije (Toskane), kar so potrdile že predhodne raziskave oljk v Sloveniji (Bandelj in sod., 2004).

Kolekcija Purisima:

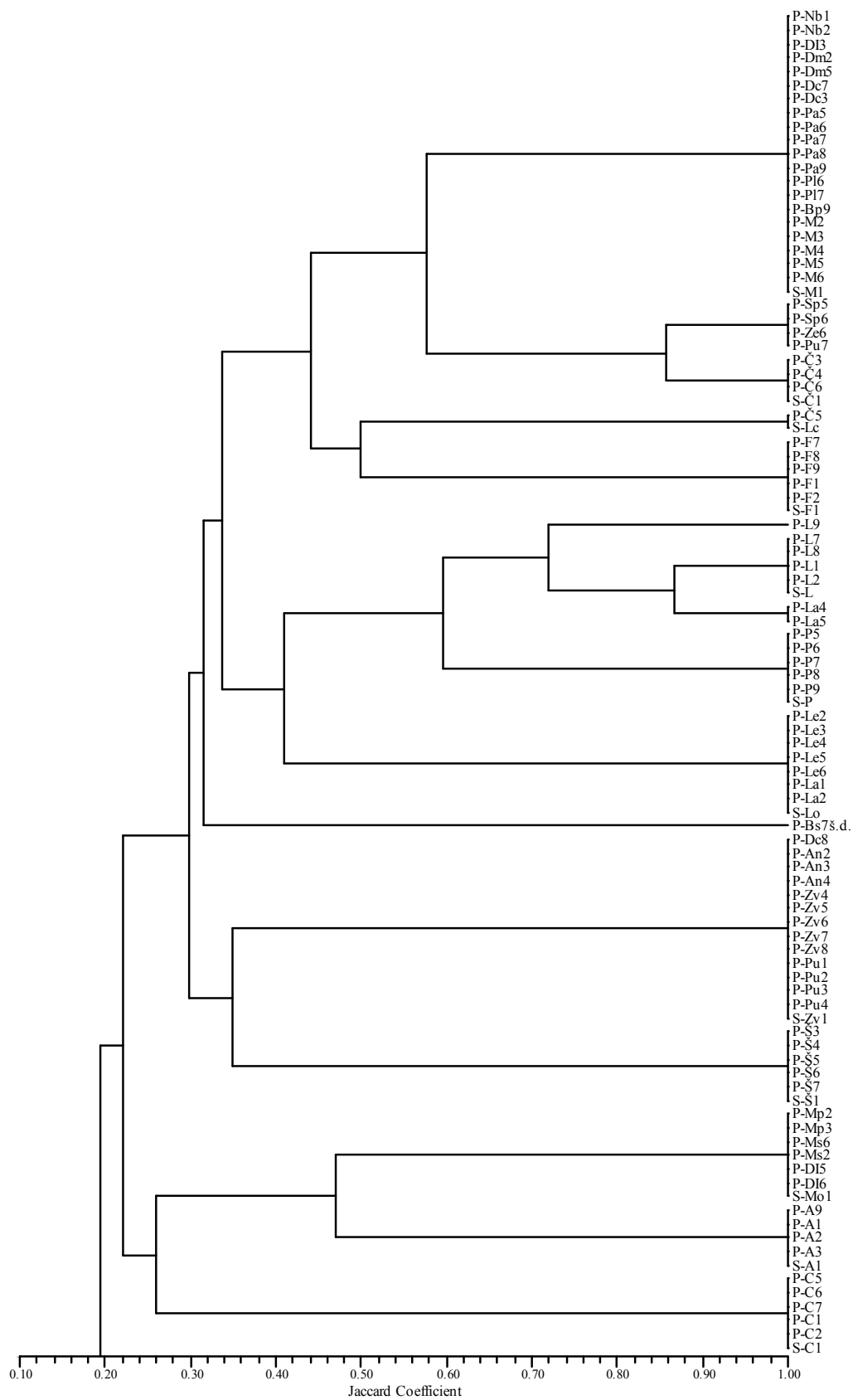
V kolekcijskem nasadu na Purisimi je bila genotipizacija opravljena na 173 drevesih, ki naj bi pripadala 37 različnim sortam. Genotipizacija na 7-ih mikrosatelitskih lokusih je pokazala, da v kolekciji kot referenčne sorte lahko obravnavamo le 19 sort od 37 zbranih: 'Arbequina', 'Belica Pucer', 'Buga', 'Cipressino', 'Coratina', 'Črnica', 'Frantoio', 'Leccino', 'Leccio del corno', 'Leccione', 'Maurino', 'Moraiolo', 'Nocellara del Belice', 'Pendolino', 'Picholine', 'Samo', 'Samo Nova vas', 'Štorta', 'Zelenjak viseča' (Preglednica 4).

Preglednica 4: Genotipi referenčnih oljčnih sort na sedmih mikrosatelitskih lokusih v kolekcijskem nasadu na Purisimi (dolžine alelov v bp).

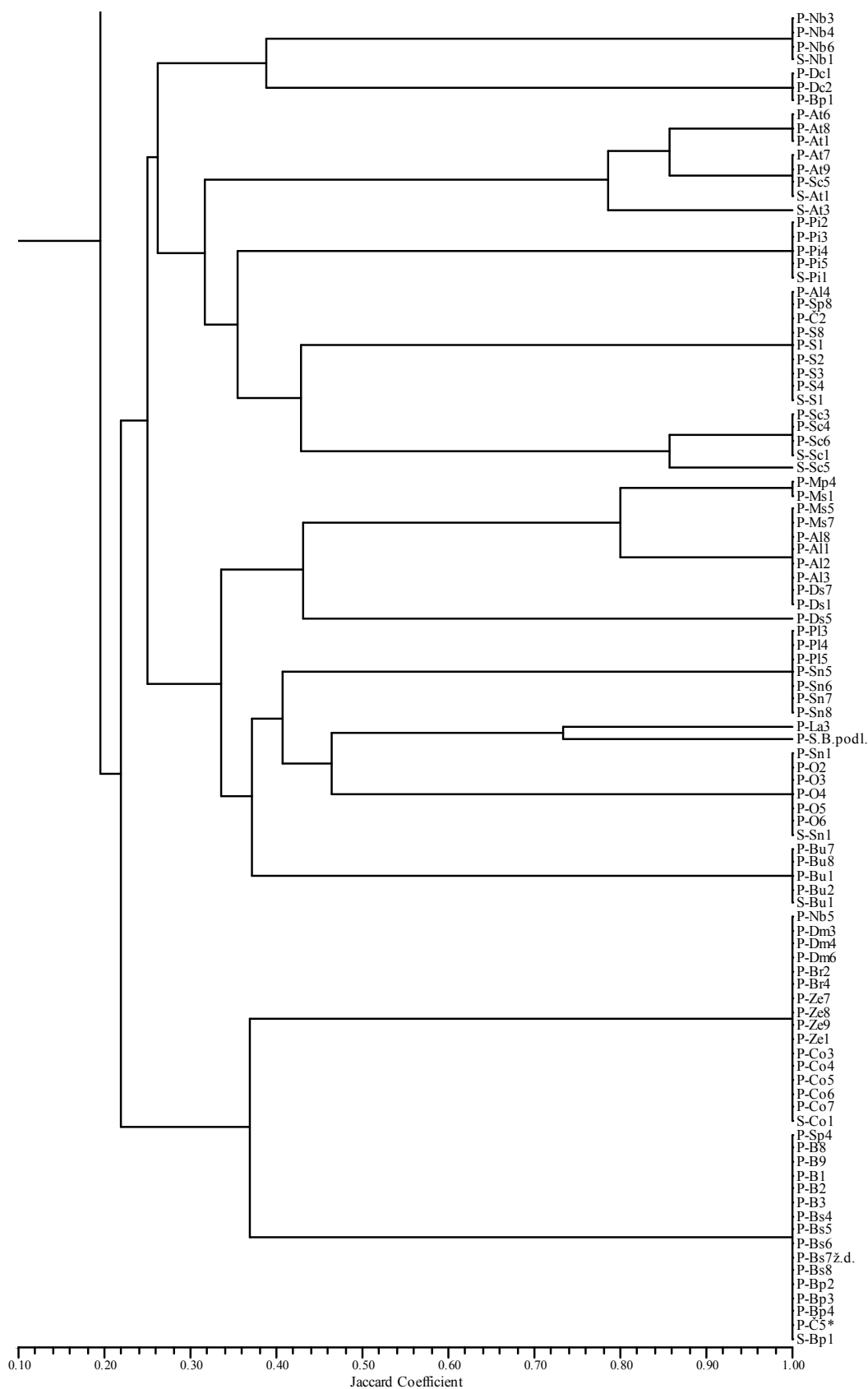
Sorta	DCA9	DCA16	GAPU101	DCA11	UDO-019	EMO-3	DCA3
'Arbequina'	183:205	123:147	186:207	145:183	130:155	214:214	228:240
'Belica Pucer'	193:193	125:172	194:218	145:165	98:130	212:214	236:246
'Buga'	193:205	150:174	192:218	145:181	130:144	205:210	236:246
'Cipressino'	162:186	150:165	194:207	130:145	130:144	210:214	238:238
'Coratina'	181:193	150:172	199:218	135:175	130:130	212:214	236:240
'Črnica'	181:193	156:174	186:192	135:145	130:167	214:214	234:250
'Frantoio'	181:205	150:156	186:199	135:183	130:167	214:214	234:240
'Leccino'	162:205	150:174	199:201	135:183/ 135:179	98:167	210:214	240:250
'Leccio del corno'	181:205	147:156	199:201	135:145	130:167	210:214	234:250
'Leccione'	162:181	150:150	192:197	135:183	130:167	210:214	240:240
'Maurino'	205:205	150:172	186:192	135:145	130:167	208:214	234:250
'Moraiolo'	183:205	150:150	194:207	145:183	130:130	214:218	228:240
'Nocellara del Belice'	162:172	150:174	201:207	151:183	130:130	210:214	240:246
'Pendolino'	162:205	150:172	199:201	145:179	98:167	210:214	240:250
'Picholine'	193:193	147:174	201:207	135:183	130:130	212:212	228:250
'Samo'	162:203	125:154	199:218	145:183	130:130	212:214	228:250
'Samo Nova vas'	162:203	150:174	192:218	165:183	130:144	210:214	236:250
'Štorta'	193:203	125:156	186:201	145:183	130:144	214:214	234:246
'Zelenjak viseča'	162:205	147:156	186:201	145:183	98:130	208:214	240:250

Za potrjevanje identitete sort in kontrolo pravilnosti opisa sadilnih mest v kolekciji Purisima smo izdelali dendrogram oz. razvrstili drevesa v sorodnostne skupine (Slika 4). V analizo sorodnosti smo vključili tudi referenčne sorte iz kolekcije v Strunjanu, ki so bile predhodno potrjene kot referenčne in standardne sorte. Rezultati analize so pokazali, da je bilo kar 59 sadilnih mest v kolekciji napačno označenih (34 % vseh mest), ki pa smo jih s pomočjo mikrosatelitov uspešno identificirali. Pri preostalih 31 drevesih smo odkrili še 11 različnih in edinstvenih genotipov, ki pa jih ne moremo primerjati z nobeno referenčno sorto oziroma za te genotipe v Sloveniji nimamo standardov. V primeru, da bi bila objavljena svetovna podatkovna baza genotipizacije vseh oljčnih sort z mikrosateliti, bi te sorte morda lahko identificirali. Tudi na Purisimi smo pri sorti 'Santa Caterina' ugotovili razlike na lokusu DCA11. Pri sorti 'Ascolana tenera' pa smo ugotovili razlike na lokusih DCA9 in DCA11, ki so prav tako lahko posledica mutacij ali poliklonskega značaja oljk.

Determinacija in vrednotenje genskih virov oljk v nacionalnih kolekcijah Slovenije z uporabo markerjev DNA



Determinacija in vrednotenje genskih virov oljk v nacionalnih kolekcijah Slovenije z uporabo markerjev DNA



Slika 4: Dendrogram UPGMA narejen na osnovi mikrosatelitskih podatkov in Jaccardovih koeficientov genetske podobnosti med 37 sortami oz. tipi oljk na Purisimi. Vzorci iz Strunjana so označeni z »S-«, iz Purisime pa s »P-«.

ZAKLJUČKI

Z mikrosatelitskimi markerji smo uspešno genotipizirali vse oljne sorte nacionalnega kolekcijskega nasada v Strunjanu in s tem vzpostavili identifikacijski sistem za 23 oljčnih sort, ki bodo v prihodnje služile kot referenčne sorte za zanesljivo identifikacijo. Kolekcija v Strunjanu je bila pravilno pripravljena in je primerna za vrednotenje sort. Za kolekcijski nasad na Purisimi pa lahko zaključimo, da ni bil premišljeno pripravljen. Ugotovljena, napačno označena sadilna mesta v kolekciji Purisima so najverjetneje posledica prisotnosti sinonimov in napačnega označevanja sadilnih mest, do katerega je prišlo pri saditvi oljk. Ti rezultati potrjujejo, da je vključevanje markerjev DNA v upravljanje z rastlinskim materialom nujno potrebno že pred pripravo same kolekcije. Kolekcija bi morala biti sestavljena iz dveh delov; prvi bi vključeval referenčne sorte s potrjeno identifikacijo, drugi del pa zbran material s terena v večjem številu ponovitev (za vsako sorto 4-5 dreves).

Karakterizacija sort oljk z mikrosatelitskimi markerji je nadgradnja vrednotenju agronomskih in kakovostnih lastnosti in zagotavlja nove, dodatne informacije o posameznih genotipih. Zaključimo lahko, da so mikrosateliti izredno dobro orodje za nedvoumno identifikacijo oljčnih genotipov ter za pregled in upravljanje kolekcijskih nasadov, saj kažejo visoko stopnjo polimorfizma, omogočajo pa tudi primerljivost rezultatov med laboratoriji. Dodana vrednost delovnega sklopa je tudi v izdelani podatkovni bazi referenčnih sort v Sloveniji, ki jo lahko vključimo v širše mednarodne podatkovne baze genotipizacije saj omogoča primerljivost rezultatov med laboratoriji. Taka podatkovna baza je pomembna za določanje identitete neznanih vzorcev, za ugotavljanje sinonimov in homonimov na mednarodni ravni, kar bo omogočalo določitev dejanskega obsega diverzitete oljk v gojenju v svetovnem merilu (dosedanje ocene se gibljejo med 1500 do 2000 sort oljk). Podatkovna baza je pomembna tudi za ugotavljanje geografskega izvora sort in s tem večji vpogled, v katerem predelu Sredozemlja je bila določena sorta izselekcionirana.

PRIPOROČILA

Kolekcije predstavljajo zbirko zbranih genotipov in služijo kot genetski rezervoarji; so izredno pomemben vir odpornosti na bolezni in škodljivce, fizioloških adaptacij na specifične ekološke dejavnike in lokalno okolje in omogočajo pridobivanje pridelkov različne kakovosti, kar je pomembno s tržnega vidika. Pri upravljanju z genskimi viri je izredno pomembno, da se zajezi in ohrani obstoječo diverzitetu na pridelovalnem območju. Zbran material mora biti proučen s pravilnimi pristopi in mora biti dostopen uporabnikom. Rezultati karakterizacije in vrednotenja morajo biti pravilno dokumentirani in prav tako dostopni uporabnikom.

V Sloveniji vzdržujemo dva kolekcijska nasada oljk, v okviru strokovnih nalog PCO na Purisimi poteka vrednotenje dreves z namenom, da bi odkrili superiorne sorte, ki bi bile lahko tržno zanimive in dobro prilagojene na lokalne pedoklimatske razmere.

Nadaljnje upravljanje kolekcij: Za oba kolekcijska nasada bi bilo potrebno voditi dnevnik nasadov, ki bi vključeval popis opravljenih del. Nujno bi bilo potrebno vzpostaviti protokole in navodila za upravljanje kolekcij, priporočamo modele, ki jih razvija organizacija Bioversity International, ki skrbi za upravljanje genskih virov kulturnih rastlin. Nujno bi bilo ustrezno dokumentirati rezultate vrednotenja dreves, saj trenutno uporabnikom ni na voljo dostopnih informacij, kar pa ni običajno za javne nacionalne kolekcijah, saj bi podatki morali biti javni in dostopni raziskovalcem in drugim ciljnim

skupinam. Predlagamo, da se za kolekcije pripravi spletni portal, ki bi omogočal javen dostop vsaj do določenih informacij.

V sklopu projekta je bil izdelan nov načrt nasada na Purisimi, obstoječo tablo z načrtom, ki je nameščena neposredno ob nasadu bi bilo potrebno zamenjati z novimi podatki. Prav tako bi bilo potrebno zaradi pomešanih sadilnih mest, pri vsakem drevesu namestiti tablico z imenom sorte/klona/akcesije, kar bi močno olajšalo delo pri vrednotenju genetskega materiala.

Razmnoževanje sadilnega materiala oljk: Oba nasada bi lahko v prihodnosti služita kot izvor matičnega sadilnega materiala za razmnoževanje sadik določenih superiornih sort v Sloveniji. V Sloveniji v zadnjih petih letih nimamo več lastne proizvodnje sadik oljk, kar za Slovenijo pomeni, da nimamo več kontrole nad pretokom in sajenjem sadilnega materiala. Za stroko je to slabo, saj nimamo več podatkov s kakšnim sadilnim materialom oljk upravljamo, katere sorte se sadijo v nove nasade, kakšna je kakovost sadik, ali gre za cepljene ali vegetativno razmnožene sadike. Do še večjih težav v praksi lahko pride denimo v primeru pojavov novih bolezni in škodljivcev ali močnejših napadov le teh, ki so v času spreminjajočih se vremenskih razmer zelo verjetni. Zaradi nepoznavanja izvornega sadilnega materiala ne vemo, kako se bodo sorte odzvale na določene spremenjene situacije. Nadzor nad sadilnim materialom in sledljivost od matičnega drevesa, proizvodnje sadike in končno do posajene sadike so ključnega pomena za doseganje konkurenčnosti slovenskega oljkarstva. To velja še posebej poudariti v času, ko so potrošniki vse bolj zahtevni in se za doseganje vrhunske kakovosti pridelanih živil želi vzpostaviti sledljivost vsakega proizvoda. Ta sledljivost se lahko začne že z matičnim rastlinskim materialom iz katerega je sadika vzgojena. Iz tega vidika priporočamo, da se obstoječa nasada vključita v ponovno proizvodnjo sadik oljk v Sloveniji in služita za pridobivanje izhodiščnega materiala za sorte, ki se bodo izkazale kot superiorne za gojenje v naših klimatskih razmerah.

Širša uporabnost kolekcij: Kolekcije bi lahko aktivno vključili v izobraževanje osnovnošolcev, srednješolcev in študentov z namenom, da bi razvijali pozitiven odnos do ohranjanja biotske raznovrstnosti kulturnih rastlin, da bi spoznali, da tudi kmetijstvo sooblikuje biodiverzitetu in pomembno prispeva k njenem ohranjanju, in navsezadnje, da bi se podučili kako veliko različnih sort oljk uspeva na majhnem pridelovalnem območju v Sloveniji, ki je v tem segmentu primerljiva z drugimi državami pridelovalkami oljčnega olja.

Delovni sklop 3: Primerjava genetskih – DNA profilov tradicionalnih (avtohtonih) in udomačenih sort pridelovalnih območij Slovenske Istre in Brd za ugotavljanje diverzitete ali identičnosti gojenih sort med območjema

NAMEN RAZISKAVE

Namen delovnega sklopa je ugotoviti ali v Slovenski Istri in v Brdih gojimo identičen ali različen genetski material, saj se v Sloveniji pogosto izpostavlja mnenje, da so nekatere sorte prisotne samo na Goriškem in druge samo v Slovenski Istri. S primerjavo profilov DNA nameravamo te domneve potrditi ali ovreči. V analizo so vključene sorte, ki jih v Sloveniji oglašujemo kot tradicionalne (avtohtone) in udomačene sorte, zato je poudarek analize na sledečih sortah: 'Buga', 'Štorta', 'Mata', 'Drobnica', 'Črnica'.

MATERIAL IN METODE

Za ugotavljanje diverzitete ali identičnosti gojenih oljčnih sort v Slovenski Istri in Brdih, smo v analizo vključili 11 različnih sort oljk iz Goriških Brd ('Ascolana tenera', 'Belica', 'Briška črnica', 'Briška Drobnica', 'Buga', 'Cipressino', 'Leccino', 'Maurino', 'Oblica', 'Pendolino', 'Štorta') (Preglednica 5). Za potrjevanje identičnosti sort iz Goriških Brd (v dendrogramu oznaka »GB-«) smo uporabili 13 referenčnih sort, ki so zbrane v kolekcijskem nasadu Strunjan (v dendrogramu oznaka »S-«) in Purisima (v dendrogramu oznaka »P-«) in so bile v Delovnem sklopu 2 genotipizirane z markerji DNA. V analizo nismo vključili sorte 'Mata', saj zanjo nimamo referenčnega genetskega profila v kolekciji Strunjan oz. Purisima. Oljčno DNA smo izolirali iz mladih listov 19 dreves iz Goriških Brd, po uveljavljenem protokolu CTAB (Kump in sod., 1992).

Preglednica 5: 19 dreves 11-ih različnih sort oljk iz Goriških Brd, s pripadajočimi oznakami.

Št.	Sorta	Oznaka	Št.	Sorta	Oznaka
1	'Ascolana tenera'	GB-At6	11	'Cipressino'	GB-C19
2	'Belica (razmnožujejo v Veroni)'	GB-B3	12	'Cipressino'	GB-C20
3	'Belica (iz Purisime)'	GB-B9	13	'Koprška Črnica'	GB-Č2
4	'Belica (cepljena na Črnico)'	GB-B10	14	'Leccino'	GB-L7
5	'Briška črnica'	GB-Č1	15	'Leccino'/'Leccione'?	GB-L/Lo11?
6	'Briška črnica'	GB-Č17	16	'Maurino'	GB-M4
7	'Briška črnica'	GB-Č18	17	'Oblica'	GB-O15
8	'Briška Drobnica'	GB-D12	18	'Pendolino'	GB-P8
9	'Buga'	GB-Bu16	19	'Štorta'	GB-Š5
10	'Cipressino'?	GB-C13?			

Za analizo mikrosatelitskega polimorfizma smo uporabili 7 lokusov: DCA3, DCA9, DCA11, DCA16 (Sefc in sod., 2000), UDO-019 (Cipriani in sod., 2002), EMO-3 (De la Rosa in sod., 2002) in GAPU101 (Carriero in sod., 2002). Reakcija PCR je potekala v skupnem volumnu 15 µl in je bila sestavljena iz 1×PCR reakcijskega pufra (Promega, Mannheim, Nemčija) [10 mM Tris-HCl (pH 8,3 na 20 °C); 1,5 mM MgCl₂; 50 mM KCl], 0,2 mM dNTP (Sigma-ALDRICH, St.

Louis, ZDA), 0,2 μ M koncentracije vsakega začetnega oligonukleotida, 0,25 μ M koncentracije univerzalnega M13 (-21) začetnega oligonukleotida, označenega s fluorescentno molekulo FAM, VIC, PET ali NED (Applied Biosystems), 0,375 enote encima Taq DNA polimeraze (Promega, Mannheim, Nemčija) in 20 ng DNA oljke. Reakcija PCR je potekala v cikličnem termostatu 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) po naslednjem temperaturnem profilu: začetna 5 min denaturacija DNA na 94 °C, 5 ciklov s ponavljanjem (45 s na 94 °C, 30 s na 57 °C, 30 s na 72 °C), kjer se je pri vsakem ciklu temperatura pri drugem koraku znižala za 1 °C, 25 ciklov s ponavljanjem (30 s na 94 °C, 30 s na 52 °C in 1 min 30 s na 72 °C) ter končna 8 min inkubacija vzorcev na 72 °C.

Za ločevanje pomnoženih markerjev smo uporabili avtomatski sekvenator ABI Prism 3130 (Applied Biosystems) in podatke analize uvozili v programski paket Gene Mapper 4.1 (Applied Biosystems). Za obdelavo podatkov smo uporabili program NTSYS 2.02 (Rohlf, 1998). Za izračun genetskih razdalj smo uporabili Jaccardov koeficient podobnosti, za razvrstitev vzorcev v skupine pa metodo UPGMA.

REZULTATI IN RAZPRAVA

Pomnoževanje mikrosatelitov je bilo uspešno na vseh sedmih analiziranih lokusih. Za potrjevanje identitete sort in primerjavo genskih profilov med sortami iz Goriških Brd in Slovenske Istre smo izdelali dendrogram oz. razvrstili drevesa v skupine (Slika 5).

Pri 8 sortah iz Goriških Brd (Oblica, Belica, Štorta, Ascolana tenera, Maurino, Leccino, Pendolino in Cipressino) smo ugotovili identičnost profilov DNA z referenčnimi profili iz Strunjana in Purisime.

Tri 'Črnice' iz Goriških Brd (GB-Č1, GB-Č17 in GB-Č18) imajo skoraj identičen genetski profil kot 'Buga' iz Strunjana. Razlikujejo se le na lokusu DCA11, kjer sta se pri 'Črnici' pomnožila alela 145:183, pri 'Bugi' pa 145:181. Vse analizirane 'Briške Črnice' imajo različen genetski profil od 'Črnice' iz Strunjana.

Tudi 'Buga' iz Goriških Brd ima drugačen genetski profil kot 'Buga' iz Strunjana.

Različni genetski profili so se pokazali tudi pri vzorcih sort 'Drobnica Lama' in 'Briška Drobnica'. V primeru sort 'Buga', 'Črnica' in 'Drobnica' govorimo o homonimih, ki so pogosti pri vegetativno razmnoženih rastlinskih vrstah. Homonimi so največkrat posledica prenašanja rastlinskega materiala med regijami. Za homonime je značilno, da so različni genotipi poimenovani z istim imenom.

Drevo z oznako 'Koprška Črnica', ki je pognala iz podlage, ima identičen genetski profil kot 'Oblica'. Drevo z oznako GB-L/Lo? se je izkazalo za sorto 'Leccino'. Drevesa iz Goriških Brd z oznako GB-D12, GB-C13, GB-Bu16 in GB-C19 niso identična nobeni od referenčnih sort iz Slovenske Istre.



Slika 5: Dendrogram UPGMA, narejen na osnovi mikrosatelitskih podatkov in Jaccardovih koeficientov genetske podobnosti med sortami oljk iz Slovenske Istre in Goriških Brd. Vzorci iz Strunjana so označeni z »S-«, iz Purisime s »P-«, iz Goriških Brd pa z »GB-«.

ZAKLJUČKI

Z izbranimi mikrosateliti smo uspešno genotipizirali vse oljčne sorte iz Goriških Brd. Domnevo o identičnosti genetskih profilov oljčnih sort iz Goriških Brd in Slovenske Istre smo potrdili za osem sort ('Ascolana tenera', 'Belica', 'Cipressino', 'Leccino', 'Maurino', 'Oblica', 'Pendolino', 'Štorta'). Goriške sorte 'Briška Črnica', 'Buga' in 'Briška Drobnica' imajo drugačen genetski profil kot istoimenske sorte v Slovenski Istri, zato gre za pojav homonimov, kar potrjuje, da v dveh pridelovalnih območjih gojimo podoben, a ne identičen genetski material starejših lokalnih sort.

PRIPOROČILA

Oljkarstvo ponuja možnost za razvoj kakovostnih in tipičnih proizvodov, ki prispevajo k večji prepoznavnosti sredozemskega območja v Sloveniji in hkrati k večji konkurenčnosti proizvajalcev na skupnem evropskem trgu. Pridobivanje oljčnega olja iz posameznih lokalnih ekotipov in pridobivanje enosortnih olj lahko za pridelovalno območje predstavlja tržno nišo, zato je poznavanje lokalnih sort izrednega pomena za določeno lokalno skupnost. S študijo smo dokazali, da se sorte Buga, Črnica in Drobnica v Brdih in Slovenski Istri razlikujejo, zato so te sorte potencialno zanimive za nadaljnjo trženje tipičnih olj posamezne regije. V Sloveniji bi bilo nujno potrebno analizirati genetsko raznolikost starih sort (Črnica, Buga, Drobnica, Mata, Štorta) in identificirati morebitne klone, saj te sorte dejansko lahko predstavljajo tržno nišo za slovensko oljgarsko skupnost.

Delovni sklop 4: *Izdelava starševskega testa z mikrosatelitskimi markerji za določitev optimalnih opraševalcev sorte 'Istrska belica' in ugotovitev kompatibilnosti sort*

NAMEN RAZISKAVE

'Istrska belica' (Slika 6) je najbolj zastopana sorta v slovenskih oljčnih in predstavlja kar 70 % vseh dreves. Pri sorti se pojavljajo težave z rodnostjo, katerih vzrokov pa ne poznamo. Sorta je poznana kot samooplodna, kar pomeni, da za oplodnjo ne potrebuje opraševalcev. Kljub temu se v literaturi opisuje, da je oplodnja bistveno boljša v primeru tujega opraševanja. Namen raziskave je s starševskim testom in molekulskimi merkerji ugotoviti v kolikšni meri se sorta dejansko sama oplodi oziroma, kateri so njeni potencialni donorji peloda.



Slika 6: Sorta 'Istrska belica'.

MATERIAL IN METODE

Za izdelavo starševskega testa sorte 'Istrska belica' smo v raziskavo prvotno vključili dve lokaciji: Osp, kjer je enosortni nasad 'Istrske belice' ter kolekcijski nasad v Strunjanu, kjer je zastopanih več potencialnih opraševalcev. Leta 2010 smo na vsaki lokaciji odbrali deset dreves 'Istrske belice' ter z vseh strani krošnje vsakega drevesa pobrali po 15 plodov.

S plodov smo najprej odstranili mezokarp, razbili endokarp ter previdno odstranili triploidni endosperm (Slika 7). Sledila je izolacija DNA iz diploidnih embrijev (Slika 8) po uveljavljenem protokolu CTAB (Kump in sod., 1996) ter merjenje koncentracije s pomočjo Qubit fluorimetra. Skupno smo imeli 50 vzorcev iz enosortnega nasada v Ospu in 50 iz mešanega nasada v Strunjanu. Izmerjene vrednosti koncentracije DNA so bile prenizke in zato

neuporabne. Odločili smo se, da bomo DNA iz diploidnih oljčnih embrijev poizkusili izolirati po protokolu, ki so ga objavili Guerin in Sedgley (2007). Embrije smo ob dodatku ekstrakcijskega pufra (100 mM Tris, pH 8,0, 20 mM EDTA, pH 8,0, s 4 mg/mL Na-dietilditiokarbamat) homogenizirali in jih hranili na ledu, dokler nismo pripravili vseh vzorcev. Vzorce smo 10 min inkubirali v vodni kopeli na 65 °C. Nato smo jim dodali še 500 µl lizirajočega pufra (100 mM Tris, pH 8,0, 20 mM EDTA, pH 8,0, z 1 M NaCl, 2% SDS in 1% Na-metabisulfit, ki smo ga dodali tik pred uporabo) in jih še 30 min inkubirali v vodni kopeli na 65 °C. Med inkubacijo smo vzorce vsakih 10 min premešali. Po končani inkubaciji smo vzorce ohladili na ledu, jim dodali 1 ml fenol:kloroform:izoamil alkohola (25:24:1) in dobro premešali. Sledilo je 10 min centrifugiranje pri 60 rpm, nato pa še 10 min pri 14.000 rpm in temperaturi 4 °C. Po centrifugiranju smo supernatant odpipetirali v novo centrifugirko, mu dodali 500 µl ledeno hladnega izopropanola, vzorce dobre premešali ter jih 1,5 ure inkubirali pri -20 °C. Sledilo je 15 min centrifugiranje pri 14000 rpm in temperaturi 4 °C. Supernatant smo odpipetirali, usedlino DNA sprali z 1 ml 76 % etanola ter vzorce posušili pri sobni temperaturi. DNA smo raztopili v 50 µl pufra TE (10mM Tris-HCl, pH 8,0, 1mM EDTA, pH 8,0).



Slika 7: Razbit endokarp.



Slika 8: Oljčni embriji.

Z novim protokolom izolacije smo iz desetih vzorcev uspešno izolirali DNA. Novembra 2011 smo v obeh oljčnih nasadih ponovno nabrali po 150 plodov. Iz plodov, nabranih v Ospu, smo takoj izolirali DNA, Strunjanske pa smo ta čas hranili na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. DNA smo uspešno izolirali iz 50 plodov iz Ospa, medtem ko smo pri Strunjanskih vzorcih dobili prenizke količine DNA. V analizo smo na koncu lahko vključili le 50 oljčnih embrijev iz Ospa, nabranih v letu 2011. Zaradi težav z izolacijo DNA iz oljčnih embrijev, nismo mogli proučiti vpliva vremenskih razmer na opravevanje ter primerjati rezultatov med leti 2010 in 2011.

Za ugotavljanje potencialnih donorjev peloda smo uporabili 7 mikrosatelitskih lokusov: DCA3, DCA9, DCA11, DCA14, DCA16 (Sefc in sod., 2000), UDO-019 (Cipriani in sod., 2002) in EMO-3 (De la Rosa in sod., 2002). Reakcija PCR je potekala v skupnem volumnu $15\text{ }\mu\text{l}$ in je bila sestavljena iz $1\times$ PCR reakcijskega pufra (Promega, Manheim, Nemčija) [10 mM Tris-HCl ($\text{pH } 8,3$ na $20\text{ }^{\circ}\text{C}$); $1,5\text{ mM}$ MgCl_2 ; 50 mM KCl], $0,2\text{ mM}$ dNTP (Sigma-ALDRICH, St. Louis, ZDA), $0,2\text{ }\mu\text{M}$ koncentracije vsakega začetnega oligonukleotida, $0,25\text{ }\mu\text{M}$ koncentracije univerzalnega M13 (-21) začetnega oligonukleotida, označenega s fluorescentno molekulo FAM, VIC, PET ali NED (Applied Biosystems), $0,375$ enote encima Taq DNA polimeraze (Promega, Manheim, Nemčija) in 20 ng DNA oljke. Reakcija PCR je potekala v cikličnem termostatu 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) po naslednjem temperaturnem profilu: začetna 5 min denaturacija DNA na $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 ciklov s ponavljanjem (45 s na $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 s na $57\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 s na $72\text{ }^{\circ}\text{C}$), kjer se je pri vsakem ciklu temperatura pri drugem koraku znižala za $1\text{ }^{\circ}\text{C}$, 25 ciklov s ponavljanjem (30 s na $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 s na $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ oz. na $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ le za lokus DCA14 in $1\text{ min } 30\text{ s}$ na $72\text{ }^{\circ}\text{C}$) ter končna 8 min inkubacija vzorcev na $72\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Za ločevanje pomnoženih markerjev smo uporabili avtomatski sekvenator ABI Prism 3130 (Applied Biosystems) in podatke analize uvozili v programski paket Gene Mapper 4.1 (Applied Biosystems). Za starševsko analizo (Gerber in sod., 2003) smo uporabili program FaMoz (<http://www.pierroton.inra.fr/genetics/labo/Software/Famoz/index.html>), ki je

primeren za starševsko analizo v primeru kodominantnih mikrosatelitskih markerjev. Za embrije, ki so imeli na določenem lokusu le en alel, ne moremo določiti ali gre za homozigota ali heterozigota z ničelnim alelom. Zato smo drugi alel obravnavali kot manjkajoč podatek in s tem preprečili nepravilno izključevanje potencialnih donorjev peloda. Za določitev mejnih vrednosti potencialnih donorjev peloda in za zmanjšanje napake zaradi pretoka genov, je bila simulacija narejena na osnovi 1000 potomcev. Ker smo imeli na razpolago genotipe vseh analiziranih embrijev in potencialnih donorjev peloda, smo najverjetnejše donorje peloda določili z izračunom vrednosti LOD (verjetnostno razmerje). Genotip z najvišjo vrednostjo LOD se upošteva kot najverjetnejši donor peloda. Višja kot je vrednost LOD za določen par starš/potomec, večja je verjetnost, da je starševska povezava pravilna. Za potencialnega starša smo torej izbrali tisti genotip oz. oljčno sorto z najvišjo vrednostjo LOD.

REZULTATI IN RAZPRAVA

Pomnoževanje s sedmimi mikrosatelitskimi lokusi je bilo uspešno pri 31 vzorcih embrijev 'Istrske belice' iz Ospa, vzorčenih v letu 2011. S pomočjo računalniškega programa FaMoz smo genotipe embrijev primerjali z referenčnimi genotipi 24 oljčnih sort ('Arbequina', 'Ascolana tenera', 'Athena', 'Belica Pucer', 'Buga', 'Cipressino', 'Coratina', 'Črnica', 'Frantoio', 'Grignan', 'Itrana', 'Leccino', 'Leccio del corno', 'Leccione', 'Maurino', 'Moraiolo', 'Nocelara del belice', 'Pendolino', 'Picholine', 'Samo', 'Samo Nova vas', 'Santa Catarina', 'Štorta', 'Zelenjak viseča') ter tako določili potencialne donorje peloda 'Istrske belice'. Najverjetnejšega donorja peloda smo določili za 18 embrijev, za 8 embrijev pa nismo določili nobenega potencialnega donorja peloda (Preglednica 6). Pri petih embrijih se je kot potencialnih donorjev peloda pojavilo več sort, ki so imeli enake vrednosti LOD. Take primere smo izločili iz nadaljnje analize. Za potencialne donorje peloda so bile vrednosti LOD od 1,44 do 5,91, v povprečju 3,36.

Preglednica 6: Število embrijev brez določenega potencialnega donorja, z več potencialnimi donorji peloda in z enim najverjetnejšim donorjem peloda.

	Število embrijev
Skupaj	31
Brez potencialnega donorja peloda	8
Več potencialnih donorjev peloda (ista vrednost LOD)	5
Potencialni donor peloda	18

Pri 16 % embrijev se je kot najverjetnejši donor peloda izkazala sorta 'Leccione'. Za 9,7 % embrijev sta se kot potencialna donorja izkazali sorti 'Leccino' in 'Leccio del corno', za 6,5 % embrijev sorti 'Ascolana tenera' in 'Picholine', za 3,2 % embrijev pa sorte 'Črnica', 'Buga' in 'Grignan' (Preglednica 7). Med vsemi analiziranimi embriji 'Istrske belice' nismo odkrili nobenega primera avtofertilnosti in vse kaže, da se sorta preferenčno oplodi s pelodom drugih sort. Pri vseh sortah, ki so se izkazale kot potencialni donorji peloda za 'Istrsko belico', se obdobja trajanja polnega cvetenja prekrivajo s trajanjem polnega cvetenja 'Istrske belice' (Matešič, 2009).

Preglednica 7: Število embrijev, določenih za domnevne donorje peloda pri sorti 'Istrska belica'.

Donor peloda	Število embrijev
'Arbequina'	0
'Ascolana tenera'	2
'Athena'	0
'Belica Pucer'	0
'Buga'	1
'Cipressino'	0
'Coratina'	0
'Črnica'	1
'Frantoio'	0
'Grignan'	1
'Itrana'	0
'Leccino'	3
'Leccio del corno'	3
'Leccione'	5
'Maurino'	0
'Moraiole'	0
'Nocelara del belice'	0
'Pendolino'	0
'Picholine'	2
'Samo'	0
'Samo Nova vas'	0
'Santa Caterina'	0
'Štorta'	0
'Zelenjak viseča'	0
Skupaj	18

ZAKLJUČKI

Zaključimo lahko, da so mikrosateliti primerno orodje za ugotavljanje starševstva, saj smo lahko z njimi določili potencialne donorje peloda 'Istrske belice'. Pomemben rezultat tega delovnega sklopa je tudi na novo vpeljana metoda izolacije DNA iz oljčnih embrijev, ki nam bo koristila za nadaljnje študije. S to raziskavo smo pridobili preliminarne rezultate, ki nam bodo v prihodnje koristili za načrtovanje obsežnejših, večletnih poskusov za določanje najverjetnejših opraševalcev 'Istrske belice' in drugih sort, za ugotavljanje avtofertilnosti oljčnih sort ter za natančnejše proučevanje vpliva vremenskih razmer na opraševanje. Za potrditev rezultatov, dobljenih s to raziskavo, bi bile potrebne nadaljnje analize, ki bi vključevale večje število analiziranih embrijev. Prav tako rezultati nakazujejo, da bo potrebno z dodatnimi poskusi proučiti, ali je sorta dejansko samooplodna.

PRIPOROČILA

Raziskave kompatibilnosti oljčnih sort v Sloveniji še niso bile opravljene, čeprav so za doseganje redne in dobre rodnosti oljčnih sort nujne. V sklopu tega projekta so bili vzpostavljeni protokoli, ki bodo omogočali nadaljevanje obširnejše raziskave. Ker na

rodnost poleg kompatibilnosti sort v veliki meri vplivajo tudi vremenski dejavniki, je potrebno raziskave izvajati več zaporednih let. Prav tako je potrebno proučiti avtosterilnost in avtofertilnost pomembnejših sort v pridelavi (Istrska belica in Leccino), predvsem pa tradicionalnih sort (Buga in Črnica), saj le te še niso bile proučene, so pa potencialno zanimive zaradi pridobivanja monosortnega olja. Zato predlagamo, da se poleg testa očetovstva z mikrosatelitskimi markerji izvede še poskuse izolacije cvetov pred fiziološko zrelostjo ter nato preveri dejanski delež samooplojenih embrijev ter samooploditev potrdi še z markerji DNA.

Delovni sklop 5: *Vrednotenje oljčnih sort v slovenskem prostoru. Namen delovnega sklopa je zaokrožiti raziskave na področju kemometričnega vrednotenja sort oljk in vzpostaviti izhodišča in smernice za nadaljnje raziskave*

NAMEN RAZISKAVE

Cilj delovnega sklopa je zbrati in statistično ovrednotiti podatke o značilnostih slovenskih oljčnih oljih v obdobju 1992-2011. V tem obdobju se je baza podatkov zbirala v okviru strokovnih nalog Poskusnega centra za oljkarstvo pri KGZS Zavod Go, v okviru raziskovalnih projektov na Univerzi na Primorskem, Znanstveno-raziskovalnem središču in na Inštitutu za ekologijo, oljčno olje in kontrolo - LABS d.o.o., zato je potrebno pregledati relevantnost podatkov in njihovo umeščenost v mednarodni prostor. Morfološke in genetske značilnosti oljk je potrebno nadgraditi s kemijskimi značilnostmi in jih primerjati s sodobnimi literaturnimi podatki. Nekateri kemijske značilnosti se spreminjajo glede na klimatske pogoje (letno), druge pa se lahko zelo razlikujejo glede na sortiment. Potreba po zbiranju in ovrednotenju dosedanje slovenske baze podatkov je nujno potrebna za nadaljne razvojno-raziskovalno delo na področju slovenskega oljkarstva in za pripravo primerne publikacije.

POTEK RAZISKOVALNEGA DELA

Raziskovalno delo je obsegalo pregled dosedanje baze podatkov, pregled ustreznosti metod, statistična obdelava podatkov in predlogi za nadaljnje razvojno-raziskovalno delo.

(1) ZBRANI DATKI KEMIJSKEGA VREDNOTENJA SORTNIH OLJČNIH OLJ, V OKVIRU RAZISKOVALNIH PROJEKTOV UP ZRS

S statističnim programom SPSS Statistics V.17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA smo obdelali do sedaj zbrane kemijske podatke naslednjih sort: 'Arbequina', 'Buga' (buga Piran, buga Tar), Buža, 'Črnica', 'Itrana', 'Komuna', 'Mata', 'Maurino', 'Štorta', 'Zmartel', 'Žižula'. Zbrani so naslednji podatki: maščobnokislinska sestava po letih, vsebnost sterolov, vsebnost tokoferolov, vsebnost biofenolov in senzorični profili. Iz literature je razvidno, da so to osnovni kemijski parametri, ki okarakterizirajo posamezne sortne značilnosti.

REZULTATI IN RAZPRAVA

Ugotovljena je pozitivna korelacija med vsebnostjo C16:1 in C16:0, negativna korelacija med C18:3 in C22:0, pozitivna korelacija med C18:2, C18:3 in vsebnostjo gama-tokoferola. Iz rezultatov maščobnokislinske sestave je razvidno, da izstopata sorti 'Mata' in 'Štorta' po večji vsebnosti linolne kisline (C18:2), nad 8,00 ut. %. Rezultati za delež posameznih triacilglicerolov (TAG) potrjujejo visoko vsebnost linolne kisline v sortah 'Mata' in 'Štorta', v oljčnih oljih najbolj zastopani TAG s particijskim številom 48 – 000 pa je najbolj zastopan v sortah 'Zmartel' in 'Štorta' – 46, 2 in 43,5 ut.%. Zanimivo je, da sorta 'Buga' najmanjši delež z 000 - le 37,2 ut.%. Primerjava 000, LOO in PLO za sorto 'Štorta' pokaže, da povišan delež linolne kisline ne gre na račun oleinske kisline, saj je 'Štorta' kljub višjemu deležu LOO in PLO zelo bogata z 000.

Natančneje smo obdelali sterolno sestavo posameznih sort. Sestavo in vsebnost sterolov smo določevali po akreditirani preskusni metodi za ugotavljanje značilnosti oljčnega olja in olja iz oljčnih tropin iz Uredbe Komisije (EGS) št. 2568/91, priloga V (EEC, 1991). Princip

metode je umiljenje in izolacija sterolov iz neumiljive frakcije s tankoplastno kromatografijo ter plinsko-kromatografska določitev le-teh po predhodnem silaniziranju, ki omogoči boljšo kromatografsko ločbo. Znano je, da se da na osnovi nekaterih sterolov diskriminirati med posameznimi oljčnimi sortami (del Alamo in sod., 2004; Sakouhi in sod., 2009a, b), zato smo med kemijske deskriptorje uvrstili tudi sterolno sestavo. Iz opravljenih analiz in zbranih podatkov, smo ugotovili, da je delež Δ -5-avenasterola pri sorti 'Istrska belica' znatno višji kot pri ostalih sortah, v povprečju 23,67% proti 4,36% v primeru sorte 'Štorta' (najmanj) oz. 7,95% v primeru sorte 'Buga' (največ). Sorti 'Črnica' in 'Mata' pa imata po 5,99 in 6,70% Δ -5-avenasterola, medtem ko ima sorta 'Leccino' 11,15% Δ -5-avenasterola. Zbrani podatki so pomembni za karakterizacijo slovenskega oljčnega olja, še posebej zato, ker za razliko od maščobnokislinske sestave vrednosti ne odstopajo med letniki.

V času projekta so bili zbrani in obdelani podatki o maščobnokislinski sestavi 400 vzorcev oljčnega olja in primerjani glede na letnik. Rezultati analize so pokazali, da se v stresnih pogojih v povprečju zvišuje linolna kislina (C18:2) in znižuje oleinska kislina (C18:3). Tako beležimo visok padec oleinske kisline v letih 1997, 2003 in 2009.

Ti podatki so statistično obdelani na UP ZRS ISKO in Labs d.o.o.

(2) PREGLED PRESKUSNIH METOD IN PRIMERJAVA KEMOMETRIČNEGA VREDNOTENJA SORT MED LABORATORIJI V SLOVENIJI

Pregledali smo preskusne metode, ki so bile uporabljene pri karakterizaciji oljčnih olj v letih 1992-2011.

Analize so bile opravljene v :

- Labs d.o.o., inštitut za ekologijo in oljčno olje (oljevitost, maščobnokislinska sestava, sterolna sestava, vsebnost biofenolov in tokoferolov),
- Agroživilskem laboratoriju KGZS – Zavoda GO (oljevitost, kislost, peroksidno število, preiskava v UV),
- Laboratoriju za preskušanje oljčnega olja na UP ZRS (raziskave: oljevitost, maščobnokislinska sestava, sterolna sestava, vsebnost biofenolov in tokoferolov),
- PCO (pridelava olja v laboratorijski oljarni, pridobitek olja),
- Nacionalni Panel za senzorično ocenjevanje deviškega oljčnega olja (za potrebe strokovnih nalog in raziskav).

2.1. Določanje vsebnosti olja, vode in koščic v plodovih

Ugotovili smo, da pri metodi za določevanje vsebnosti olja, vode in koščic v plodovih ni bila zagotovljena sledljivost, ni bilo prenosa metode in rezultatov pridobljenih od leta 1993-1999 v laboratoriju Labs d.o.o. z metodo in podatki pridobljenimi po letu 2000 v Gorici. Predlagamo, da se za publikacijo statistično obdela samo podatke iz laboratorija KGZS-Zavod GO, ker je potekalo spremljanje oljevitosti v daljšem obdobju.

2.2 Določevanje biofenolov (polifenolov)

Določevanje biofenolov je zelo pomemben segment karakterizacije oljčnega olja, predvsem pri karakterizaciji ekstra deviškega oljčnega olja z zaščiteno označbo porekla. Za določevanje biofenolov v oljčnem olju je znanih več nestandardnih metod. V okviru IOC so potekala prizadevanja za poenotenje določevanja biofenolov v oljčnem olju, pri čemer je aktivno

sodeloval tudi naš laboratorij. Sodelovali smo v medlaboratorijski primerjavi na podlagi katere je metodo Upravljalni odbor Evropska komisija DG AGRI za skupno ureditev trga predlagal za sprejem v zakonodajo. Predlagana metoda je HPLC metoda. Slovenska baza podatkov o vsebnosti biofenolov je do leta 2009 temeljila na spektrofotometričnem določanju skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteujevim reagentom (T. Gutfinger). Ta metoda ni specifična (vpliv sladkorjev, karotenoidov, razmerje med enostavnimi in kompleksnimi biofenoli). Predlagamo, da se mejna vrednost za geografsko poreklo v naslednjih petih letih ustrezno spremeni, saj pričakujemo, da se bodo tudi v mednarodnem prostoru v naslednjih petih letih upoštevale le HPLC določitve. Pri statistični obdelavi podatkov o sortah smo obravnavali HPLC metodo, ki jo je predlagal IOC. Rezultati primerjave določanja biofenolov so predstavljeni v Preglednici 8.

Determinacija in vrednotenje genskih virov oljk v nacionalnih kolekcijah Slovenije z uporabo markerjev DNA

Preglednica 8: Primerjava spektrofotometrične metode (T.Gutfinger) in nove HPLC metode

T. Gutfinger	280 nm								
CELOKUPNI BF (mg/kg)	SKUPNI HPLC BF (mg/kg)	Neassignirani BF	TyrOH	Tyr	DMO-Agl-dA	DML-Agl-dA	Lignani	O-Agl-A	L-Agl-A
174	232	79	32,0	37,0	52,5	18,7	2,7	7,1	3,2
406	510	189	40,8	47,1	142,6	46,5	9,4	26,1	8,6
615	815	451	6,0	6,9	71,4	70,3	83,9	81,0	43,6
224	272	81	49,2	28,0	77,2	21,0	4,5	7,7	3,1
391	537	143	1,9	2,6	253,9	105,2	7,1	18,6	4,1
507	613	335	34,3	101,8	21,0	19,7	34,9	40,0	26,3
363	451	169	42,6	62,4	51,3	32,1	38,0	33,0	17,9
248	235	76	40,7	21,8	71,2	16,7	4,1	2,3	2,0
294	419	97	48,8	32,6	158,9	64,7	5,2	6,1	5,4
366	436	177	36,4	61,8	41,2	27,3	39,0	30,1	16,8
497	370	201	20,0	35,5	18,2	18,0	39,8	23,6	13,4
142	194	79	22,2	20,4	43,5	13,1	3,3	2,7	2,2
165	210	66	30,9	25,1	58,0	14,6	4,2	1,9	3,4
592	766	428	5,9	3,9	84,5	78,2	75,3	56,2	20,5
74	127	60	1,2	7,9	12,0	18,7	2,8	1,1	18,5
429	551	307	9,7	24,3	58,2	51,9	51,6	37,0	11,3
255	322	163	8,6	24,5	27,3	28,1	42,9	19,0	8,6
167	245	86	28,9	13,3	74,2	18,7	4,7	2,1	8,4
177	247	85	43,6	15,6	71,8	18,5	4,6	1,3	6,2
160	196	74	37,2	22,6	32,8	13,2	4,0	1,7	10,9
163	243	104	14,1	10,9	77,8	21,0	5,0	2,0	7,8
312	389	155	11,5	17,3	81,6	50,8	36,3	23,2	13,6
302	357	160	27,7	29,1	43,4	29,8	38,6	13,6	15,2
215	313	137	19,9	28,8	46,4	36,0	26,7	7,5	10,1
124	230	95	10,4	16,6	27,7	23,9	19,0	3,9	33,5
300	429	163	21,8	34,6	64,8	68,9	35,8	30,7	8,9
303	352	169	7,1	12,9	39,3	45,7	41,0	24,7	12,2
347	441	227	5,0	10,2	62,3	46,1	51,7	26,4	12,7
331	392	184	12,0	22,5	44,5	46,6	48,8	23,8	10,0
264	351	154	10,3	28,1	44,0	43,2	39,2	25,0	6,7
45	379	303	0,2	1,8	0,5	0,8	34,9	1,9	36,1
116	198	75	2,2	7,6	6,9	7,0	67,8	2,7	28,4
36	263	205	0,0	2,1	0,6	2,0	0,7	0,7	52,3
246	346	125	20,2	18,0	122,1	33,3	3,1	8,5	15,3
81	326	231	3,8	4,3	10,1	4,6	14,6	1,7	55,9
147	199	59	1,1	2,9	76,2	50,2	3,7	1,7	3,9
134	171	65	10,8	13,1	52,6	20,6	3,4	2,2	3,5
552	642	330	33,3	63,5	50,4	45,4	56,0	39,4	23,7
347	461	213	6,5	21,4	64,5	53,8	44,5	37,5	20,0
227	337	86	1,4	3,9	141,5	90,0	4,8	4,0	5,6
28	108	46	0,0	0,8	0,7	1,4	42,2	2,8	13,6
66	97	55	1,2	3,7	10,2	9,0	12,4	3,3	2,5
60	141	69	0,8	13,8	1,7	6,5	26,4	0,7	22,8

Determinacija in vrednotenje genskih virov oljk v nacionalnih kolekcijah Slovenije z uporabo markerjev DNA

Iz preglednice je razvidno, da so med metodama zelo velika odstopanja predvsem pri nizkih koncentracijah (vrednost pretvorbene faktorja je neuporabna, ker so razlike posledica specifične biofenolne sestave posamezne sorte, koncentracije biofenolov v času analiziranja oziroma pretvorbeneh produktov, ki so odvisni od oksidacijskega stanja oljčnega olja. Zato za nadaljnje zbiranje podatkov priporočamo uporabo HPLC metode.

Preglednica 9: Primerjava rezultatov vsebnosti skupnih biofenolov z dveh različnih tekočinskih kromatografih (HP 1050 in HP 1100).

HPLC 1050 - sekvence		REZULTATI 1050	REZULTATI 1100	HPLC 1100 - sekvence
BP50 12	OL 289	473	423	BIS_16
BP50 05	OL 290	472	425	BIS_15
BP50 05	OL 290	133	123	BIS_15
BP50 05	OL 291	573	558	BIS_15
BP50 05	OL 292	344	332	BIS_15
BP50 12	OL 294	133	99	BIS_14
BP50 08	OL 294	131	101	BIS_16
BP50 08	OL 294	116	107	BIS_16
BP50 12	OL 295	120	105	BIS_14
BP50 3	OL 295	103	93	BIS_16
BP50 12	OL 296	103	95	BIS_14
BP50 04	OL 296	121	124	BIS_17
BP50 04	OL 296	113	117	BIS_17
BP50 04	OL 297	466	427	BIS_17
BP50 05	OL 298	459	424	BIS_15
BP50 05	OL 298	537	489	BIS_15
BP50 08	OL 382	536	486	BIS_16
BP50 08	OL 382	376	323	BIS_16
BP50 08	OL 383	364	327	BIS_16
BP50 08	OL 383	226	200	BIS_16
BP50 08	OL 384	224	202	BIS_16
BP50 08	OL 384	246	218	BIS_16
BP50 07	OL 385	244	215	BIS_18
BP50 07	OL 385	474	420	BIS_18
BP50 08	OL 386	471	407	BIS_16
BP50 08	OL 386	191	174	BIS_16
BP50 08	OL 387	105	91	BIS_16
BP50 08	OL 388	107	89	BIS_16
BP50 08	OL 388	132	116	BIS_16
BP50 07	OL 389	134	119	BIS_18
BP50 07	OL 389	292	248	BIS_18

Determinacija in vrednotenje genskih virov oljk v nacionalnih kolekcijah Slovenije z uporabo markerjev DNA

BP50 07	OL 390	294	253	BIS_18
BP50 07	OL 390	650	583	BIS_18
BP50 07	OL 391	651	582	BIS_18
BP50 07	OL 391	310	263	BIS_18
BP50 09	OL 392	309	264	BIS_18
BP50 09	OL 392	448	397	BIS_18
BP50 09	OL 393	451	397	BIS_18
BP50 09	OL 393	314	278	BIS_18
BP50 09	OL 394	294	274	BIS_18
BP50 09	OL 394	611	564	BIS_18
BP50 09	OL 395	606	550	BIS_18
BP50 09	OL 395	274	247	BIS_18

Nadaljnje zbiranje podatkov o vsebnostih biofenolov v oljčnih oljih je potekalo s HPLC metodo na dveh različnih detektorjih (z UV detektorjem in Diode Array detektorjem). Iz rezultatov je razvidno, da so odstopanja znotraj merilne negotovosti metode; oziroma je izračunani pretvorbeni faktor 1,12.

2.3 Določevanje maščobnokislinske sestave, sterolne sestave in vsebnosti skupnih sterolov

Določevanje omenjenih parametrov se je izvajalo tako za strokovne kot tudi za raziskovalne naloge na istem plinskem kromatografu po metodah opisanih v Prilogah V, XA in XB Uredbe komisije 2568/91.

2.4 Določevanje vsebnosti tokoferolov

Določanje vsebnosti tokoferolov je teklo na istem tekočinskem kromatografu tako za strokovne naloge kot tudi za potrebe raziskovalnega dela. Podatki o vsebnosti tokoferolov (vitamina E) kažejo na velike razlike vsebnosti glede na sorto in glede na čas določitve. Za oljčna olja je značilna visoka vsebnost alfa tokoferola (od 50- 400 mg/kg olja) in zelo nizka vsebnost gama-tokoferola. Zelo pomembno je, da pri statistični obdelavi podatkov zajamemo podatke svežih olj, saj v nasprotnem primeru rezultati niso primerljivi in sortno karakteristični.

OPOMBE: Leta 2007 je v okviru projekta UELIJE potekala karakterizacija goriškega oljčnega olja. Analize je opravil italijanski partner, v brošuri niso navedene metode dela. S karakterizacijo oljčnih olj so pričeli v letu 2009 tudi na Univerzi v Gorici.

3. OBDELAVA ZBRANIH PODATKOV O MORFOLOŠKIH IN KEMIJSKIH ZNAČILNOSTI POSAMEZNIH SORT V OKVIRU POSKUSNEGA CENTRA ZA OLJKARSTVO

V sodelovanju s Poskusnim centrom za oljkarstvo pri KGZS-Zavod GO (PCO) smo pričeli z obdelavo dosedaj zbranih podatkov o morfoloških značilnosti posameznih sort. Glede na obilno število podatkov smo v skladu z dogovori in grobim pregledom opravljenih del pričeli z obdelavo 24 sort. Izbrali smo sorte, za katere je PCO zbiral morfološke značilnosti vsaj tri leta in so tudi bile opravljene nekatere kemijske značilnosti. Baza kemijskih analiz je

Determinacija in vrednotenje genskih virov oljk v nacionalnih kolekcijah Slovenije z uporabo markerjev DNA

pomanjkljiva in nesistematična, zato smo jo poskušali dopolniti z bazo podatkov o značilnostih slovenskega oljčnega olja iz baze podatkov UP ZRS-ja in LABS d.o.o. Žal tudi združena banka kemijskih podatkov ne omogoča dovolj dobre statistične obdelave, zato bi morali nekatere manjkajoče podatke še pridobiti z nadaljnim delom.

Zbrani sopodatki za morfološke opise drevesa, lista, socetja, plodu in koščice za sorte 'Arbequina', 'Ascolana', 'Buga', 'Cipresino', 'Coratina', 'Črnica', 'Drobnica', 'Frantoio', 'Belica', 'Grignan', 'Itrana', 'Leccino', 'Leccione', 'Leccio del Corno', 'Maurino', 'Mata', 'Nocellara del Belice', 'Oblica', 'Pendolino', 'Picholine', 'Moraiolo', 'Štorta' in 'Santa Caterina', vendar je zaradi preobilice podatkov po mnenju vodje PCO potrebna še:

- dokončna ureditev podatkov meritev (kraj, naslovi, imena, podatki...)
- priprava vseh pojasnil oz. legend (Pu, SN, S...)
- vnos lokacije in povezave z google ... (koordinate)
- priprava zbirke opisnega dela sort (množica podatkov)
- dokončna ureditev fotografij (trenutno so bile zbrane samo v mapo, označene z imeni...)

Preglednica 10: Popis baze kemijskih podatkov za izbranih 24 sort

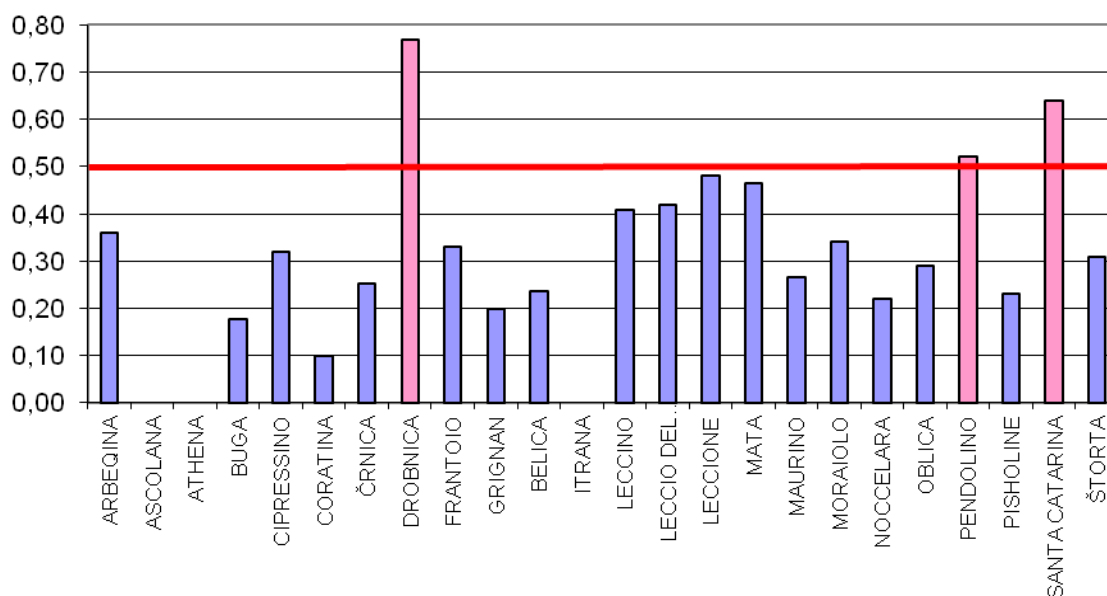
	SORTA	ŠTEVILO VZORCEV ZA OBDELAVO PODATKOV			
		MAŠČOBNO KISLINSKA SESTAVA	STEROLI	BF	TOKO
1	ARBEQUINA	4	1	2	3
2	ASCOLANA TENERA	2	NI	1	3
3	ATHENA	2	NI	1	4
4	BUGA	7	7	5	8
5	CIPRESSINO	2	1	1	4
6	CORATINA	3	1	2	5
7	ČRNICA	8	8	8	9
8	DROBNICA	1	1	1	3
9	FRANTOIO	2	1	1	4
10	GRIGNAN	3	1	2	4
11	BELICA	10	10	10	10
12	ITRANA	2	NI	1	4
13	LECCINO	10	10	10	10
14	LECCIO DEL CORNO	3	1	2	5
15	LECCIONE	2	1	2	4
16	MATA	9	10	10	13
17	MAURINO	8	2	6	6
18	MORAIOLO	2	1	1	4
19	NOCCELARA	1	1	1	3
20	OBLICA	3	2	3	3
21	PENDOLINO	2	1	1	3
22	PISHOLINE	3	1	2	5
23	SANTA CATARINA	1	1	NI	2

24	ŠTORTA	4	5	4	7
----	--------	---	---	---	---

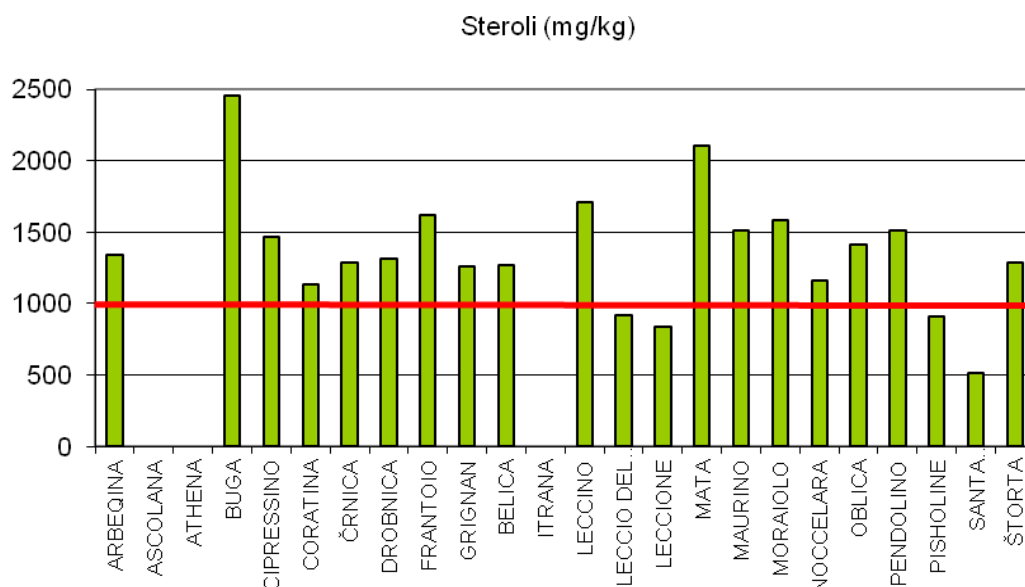
Predlagamo, da se manjkajoče podatke (rumeno in roza obarvana polja) čim prej zbere v naslednjih razvojno-raziskovalnih projektih, da bi lahko izdali publikacijo o sortnih značilnostih, z mednarodno primerljivimi metodami obdelave.

V nadaljevanju so predstavljeni kemijski parametri, ki izražajo sortne značilnosti in niso odvisni od podnebnih dejavnikov. Ti parametri so izredno dober sortni marker: Δ -7-stigmastenol (Slika 9), steroli (Slika 10) in Δ -5-avenasterol (Slika 11).

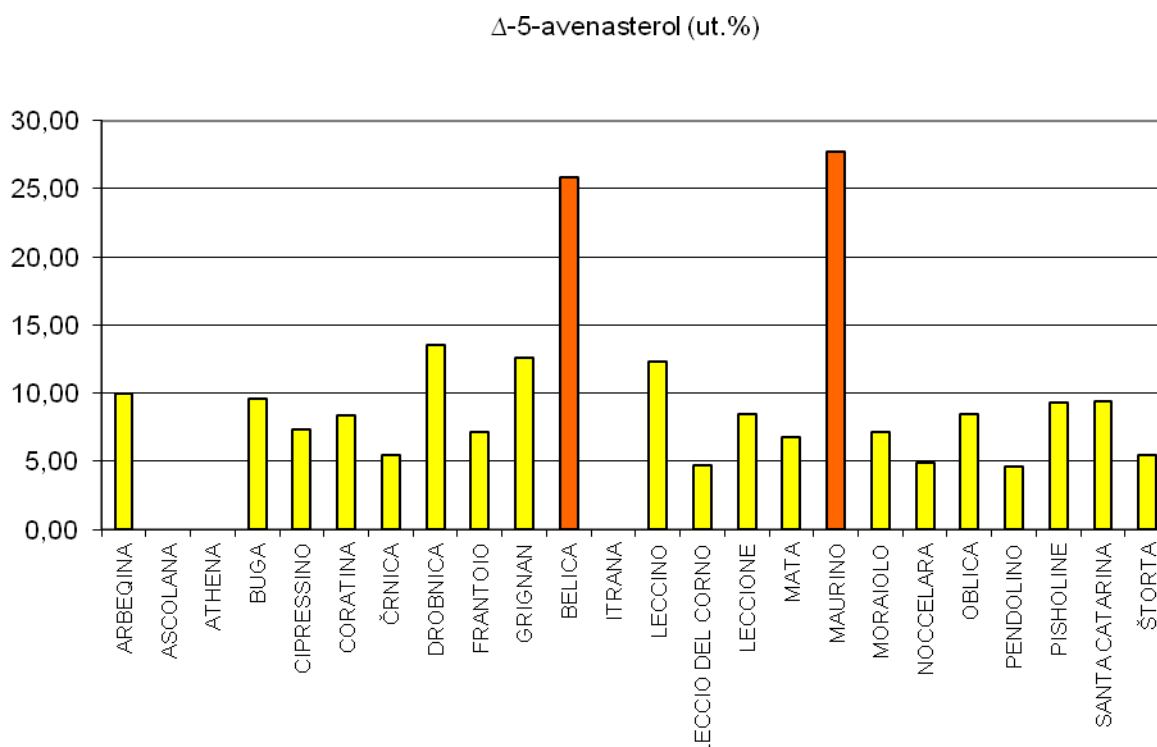
Δ -7-stigmastenol (mejna vrednost 0,5 ut.%)



Slika 9: Sortne razlike v vsebnosti delta -7-stigmastenola.



Slika 10: Vsebnosti skupnih sterolov po sortah.



Slika 11: Vsebnosti delta-5-avenasterola po sortah.

PRIPOROČILA

Za nadaljnje delo na opisu morfoloških in kemijskih značilnosti posameznih sort priporočamo:

- **Zaključitev morfoloških in kemijskih opisov za 24 izbranih sort** : 'Arbequina', 'Ascolana', 'Buga', 'Cipresino', 'Coratina', 'Črnica', 'Drobnica', 'Frantoio', 'Belica', 'Grignan', 'Itrana', 'Leccino', 'Leccione', 'Leccio del Corno', 'Maurino', 'Mata', 'Nocellara del Belice', 'Oblica', 'Pendolino', 'Picholine', 'Moraiolo', 'Štorta' in 'Santa Caterina'.

Po mnenju vodje PCO je potrebno zaradi preobilice zbranih in še neobdelanih podatkov prednostno:

- dokončno urediti podatke meritev (kraj, naslovi, imena, podatki..)
- vnos lokacije (koordinate) in povezave z Googlom
- pripraviti vsa pojasnila oz. legende (Pu, SN, S...)

Za kemijske opise izbranih sort bi morali zbrati podatke še v letu 2012 za vsebnosti sterolov, maščobnokislinsko sestavo, biofenolov in tokoferolov za vse izbrane sorte.

Letnik 2012 je izjemen glede različnih vplivov podnebnih sprememb, ki bi se morali odražati v karakterizaciji oljčnega olja. Zato je nujno potrebno, da bi ta letnik podrobneje okarakterizirali, da bi lahko z opravljenimi analizami potrdili oziroma zavrgli dosedanje ugotovitve glede parametrov, ki so zelo odvisni od podnebnih razmer kot so npr. maščobnokislinska sestava, vsebnost biofenolov in tokoferolov raziskave, od sterolne sestave, ki se je do sedaj izkazala kot dober sortni marker.

Šele tako oblikovana in za obdobje 1992-2012 zaključena baza podatkov bi omogočila podatke s katerimi bi se lahko strateško odločali o nadaljnjem delu karakterizacije slovenskega oljčnega olja in posledično umeščenosti le tega v mednarodni prostor.

POVZETEK KONČNIH PRIPOROČIL

Kolekcije predstavljajo zbirko zbranih genotipov in služijo kot genetski rezervoarji; so izredno pomemben vir odpornosti na bolezni in škodljivce, fizioloških adaptacij na specifične ekološke dejavnike in lokalno okolje in omogočajo pridobivanje pridelkov različne kakovosti, kar je pomembno s tržnega vidika. Pri upravljanju z genskimi viri je izredno pomembno, da se zajezi in ohrani obstoječo diverzitetu na pridelovalnem območju. Zbran material mora biti proučen s pravilnimi pristopi, rezultati karakterizacije in vrednotenja morajo biti pravilno dokumentirani in dostopni uporabnikom kolekcij. V okviru strokovnih nalog Poskusnega centra za oljkarstvo, ki deluje v okviru Kmetijsko-gozdarske zbornice Slovenije – Zavod GO, v Sloveniji vzdržujemo dva kolekcijska nasada oljk, v Strunjanu in na Purisimi. V kolekcijah poteka vrednotenje zbranega genetskega materiala z namenom, da bi odkrili superiorne sorte, ki bi bile lahko tržno zanimive in dobro prilagojene na lokalne pedoklimatske razmere.

Rezultati so pokazali, da je bilo v zadnjih desetih letih največ storjenega na področju evidentiranja sort na terenu ter morfološkega vrednotenja. Istočasna odsotnost raziskav na nivoju molekule DNA in manipulacija z genetskim materialom sta privedla do nekaterih neprimernih odločitev pri upravljanju z genskimi viri oljk v Sloveniji. Dokaz temu je nacionalna kolekcija na Purisimi, kjer so sorte na sadilnih mestih pomešane. Kljub molekularni identifikaciji sadilnih mest z markerji DNA, ocenjujemo, da kolekcija uporabnikom ni prijazna in ne omogoča vzorčenja brez prisotnosti poznavalca kolekcije, kar pa ni v skladu z dobro prakso pri upravljanju kolekcij. **Za boljše upravljanje kolekcij oljk v Sloveniji v nadaljevanju podajamo nekaj pomembnejših priporočil:**

-Vodenje dnevnikov kolekcijskih nasadov s popisi opravljenih del;

-Vzpostavitev protokolov in navodil za upravljanje kolekcij, priporočamo modele, ki jih razvija organizacija Bioversity International, ki skrbi za upravljanje genskih virov kulturnih rastlin;

-Nujno je ustrezno dokumentirati rezultate vrednotenja dreves, saj trenutno uporabnikom ni na voljo dostopnih informacij, kar pa ni običajno za javne nacionalne kolekcijah, saj bi podatki morali biti javni in dostopni raziskovalcem in drugim ciljnim skupinam;

-Predlagamo, da se za kolekcije pripravi spletni portal, ki bi omogočal javen dostop vsaj do določenih informacij;

-Izdelati je potrebno informacijsko tablo z novim načrtom v nasadu Purisima ter za boljše preglednost kolekcije in v izogib napačnemu vzorčenju dreves, pri vsakem drevesu namestiti tablico z imenom sorte/kлона/akcesije, kar bi močno olajšalo delo pri vrednotenju genetskega materiala;

-Uporabnost kolekcij: Oba nasada bi lahko v prihodnosti služila kot izvor matičnega sadilnega materiala za razmnoževanje sadik določenih superiornih sort v Sloveniji;

-Širša uporabnost kolekcije: vključevanje kolekcije v izobraževanje ciljnih skupin in turizem.

V Sloveniji v zadnjih petih letih nimamo več lastne proizvodnje sadik oljk, kar za Slovenijo pomeni, da nimamo več kontrole nad pretokom in sajenjem sadilnega materiala. Za stroko je to slabo, saj nimamo več podatkov s kakšnim sadilnim materialom oljk upravljamo, katere sorte se sadijo v nove nasade, kakšna je kakovost sadik, ali gre za cepljene ali vegetativno razmnožene sadike. Do še večjih težav v praksi lahko pride denimo v primeru pojavov novih bolezni in škodljivcev ali močnejših napadov le teh, ki so v času spreminjajočih se vremenskih razmer zelo verjetni. Zaradi nepoznavanja izvirnega sadilnega materiala ne vemo, kako se bodo sorte odzvale na določene spremenjene situacije. Nadzor nad sadilnim materialom in sledljivost od matičnega drevesa, proizvodnje sadike in končno do posajene sadike so ključnega pomena za doseganje konkurenčnosti slovenskega oljkarstva. To velja še posebej poudariti v času, ko so potrošniki vse bolj zahtevni in se za doseganje vrhunske kakovosti pridelanih živil želi vzpostaviti sledljivost vsakega proizvoda. Ta sledljivost se lahko začne že z matičnim rastlinskim materialom iz katerega je sadika vzgojena. Iz tega vidika priporočamo, da se obstoječa nasada vključita v ponovno proizvodnjo sadik oljk v Sloveniji in služita za pridobivanje izhodiščnega materiala za sorte, ki se bodo izkazale kot superiorne za gojenje v naših klimatskih razmerah.

Rezultati v projektu so pokazali, da imamo v Sloveniji pestro genetsko strukturo oljk, saj je poleg 33 referenčnih sort v obeh kolekcijah in dodatnih 11 genotipov na Purisimi, bilo na terenu odkritih še 29 različnih genotipov. Slednje bi bilo smiselno razmnožiti in posaditi v nacionalno kolekcijo. Le redka drevesa od teh 29 genotipov so poimenovana z imenom sorte, največ pa je takih, ki imajo delovno ime, zato bi se bilo potrebno odločiti kako se bodo poimenovali v kolekciji. **Glede na to, da so bile v času morfološkega vrednotenja poimenovane z delovnim imenom, bi predlagali, da tako poimenovanje ostane tudi v bodoče zaradi sledljivosti rezultatov.**

Oljkarstvo ponuja možnost za razvoj kakovostnih in tipičnih proizvodov, ki prispevajo k večji prepoznavnosti sredozemskega območja v Sloveniji in hkrati k večji konkurenčnosti proizvajalcev na skupnem evropskem trgu. Pridobivanje oljčnega olja iz posameznih lokalnih ekotipov in pridobivanje enosortnih olj lahko za pridelovalno območje predstavlja tržno nišo, zato je poznavanje lokalnih sort izrednega pomena za določeno lokalno skupnost. S študijo smo dokazali, da se sorte Buga, Črnica in Drobica v Brdih in Slovenski Istri razlikujejo, zato so te sorte potencialno zanimive za nadaljnjo trženje tipičnih olj posamezne regije. **V**

Sloveniji bi bilo nujno potrebno analizirati genetsko raznolikost znotraj starih sort (Črnica, Buga, Drobница, Mata, Štorta) in identificirati morebitne klone, saj te sorte dejansko lahko predstavljajo tržno nišo za slovensko oljgarsko skupnost.

Raziskave kompatibilnosti oljčnih sort v Sloveniji še niso bile opravljene, čeprav so za doseganje redne in dobre rodnosti oljčnih sort nujne. V sklopu projekta so bili vzpostavljeni protokoli, ki bodo omogočali nadaljevanje obširnejše raziskave. Ker na rodnost poleg kompatibilnosti sort v veliki meri vplivajo tudi vremenski dejavniki, je potrebno raziskave izvajati več zaporednih let. Prav tako je potrebno proučiti avtosterilnost in avtofertilnost pomembnejših sort v pridelavi (Istrska belica in Leccino), predvsem pa tradicionalnih sort, saj le te še niso bile proučene, so pa potencialno zanimive zaradi pridobivanja monosortnega olja. **Zato predlagamo, da se poleg testa očetovstva z mikrosatelitskimi markerji izvede še poskuse izolacije cvetov pred fiziološko zrelostjo ter nato preveri dejanski delež samoopljenih embrijev ter samooploditev potrdi še z markerji DNA.**

Večina raziskav kulturnih rastlin prehaja na nivo molekule DNA, saj so fiziološki in biokemijski procesi ter njihovi končni produkti zapisani v molekuli DNA. Trend raziskav na področju genetike v svetu gre v identifikacijo genov, ki so odgovorni za sintezo kakovostnih prametov živil in bioloških molekul, ki so pomembne za zdravje človeka. Proučevanje izražanja genov v odvisnosti od agronomske prakse postaja vse bolj pomembno za doseganje konkurenčne proizvodnje oljčnega olja. V naslednjem desetletju bi tudi v Sloveniji morali raziskave usmeriti v to področje. Ker se soočamo z ekstremnimi vremenskimi razmerami, bi morali razmišljati tudi o žlahtnjenju oljke in točno določenemu križanju primernih sort, ki bi doprinesle pozitivne učinke na kakovost, odpornost in rodnost slovenskih oljk. Gre za dolgoročne raziskave, ki pa bi jih v Sloveniji morali nujno pričeti.

Za nadaljnje delo na opisu morfoloških in kemijskih značilnosti posameznih sort priporočamo zaključitev morfoloških in kemijskih opisov za 24 izbranih sort : 'Arbequina', 'Ascolana', 'Buga', 'Cipresino', 'Coratina', 'Črnica', 'Drobница', 'Frantoio', 'Belica', 'Grignan', 'Itrana', 'Leccino', 'Leccione', 'Leccio del Corno', 'Maurino', 'Mata', 'Nocellara del Belice', 'Oblica', 'Pendolino', 'Picholine', 'Moraiolo', 'Štorta' in 'Santa Caterina'. Po mnenju vodje PCO je potrebno zaradi preobilice zbranih in še neobdelanih podatkov prednostno:

- dokončno urediti podatke meritev (kraj, naslovi, imena, podatki..),
- vnos lokacije (koordinate) in povezave z Googlom,
- pripraviti vsa pojasnila oz. legende (Pu, SN, S...).

Za kemijske opise izbranih sort bi morali zbrati podatke še v letu 2012 za vsebnosti sterolov, maščobnokislinsko sestavo, biofenolov in tokoferolov za vse izbrane sorte. Letnik 2012 je izjemen glede različnih vplivov podnebnih sprememb, ki bi se morali odražati v karakterizaciji oljčnega olja. Zato je nujno potrebno, da bi ta letnik podrobneje okarakterizirali, da bi lahko z opravljenimi analizami potrdili oziroma zavrgli dosedanje ugotovitve glede parametrov, ki so zelo odvisni od podnebnih razmer kot so npr. maščobnokislinska sestava, vsebnost biofenolov in tokoferolov raziskave, od sterolne sestave, ki se je do sedaj izkazala kot dober sortni marker.

Šele tako oblikovana in za obdobje 1992-2012 zaključena baza podatkov bi zagotovila ustrezne informacije s pomočjo katerih bi se lahko strateško odločali o nadaljnjem delu karakterizacije slovenskega oljčnega olja in posledično umeščenosti le tega v mednarodni prostor.

LITERATURA

- Bandelj, D., Jakše, J., Javornik, B. 2004. Assessment of genetic variability of olive varieties by microsatelliet and AFLP markers. *Euphytica*, 136, 93-102.
- Carriero, E., Fontanazza, G., Cellini, F., Giorio, G. 2000. Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 104, 301 – 307.
- Cipriani, G., Marrazo, M.T., Marconi, R., Cimato, A., Testolin, R. 2002. Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars. *Theor. Appl. Genet.*, 104, 223 – 228.
- De la Rosa, R., James, C.M., Tobutt, K.R. 2002. Isolation and characterisation of polymorphic microsatellites in olive (*Olea europaea* L.) and their transferability to other genera in the Oleaceae. *Mol. Ecol.*, 2, 265 – 267.
- Fontanaza, G. 1996. Aspetti genetici e tecniche di propagazione per piantagioni intensive. V: *Enciclopedia Mondiale dell' Olivo*. Plaza & Janés (Eds.), Sabadell, Spain, Consiglio Oleicolo Internazionale EGEDSA, 122 – 134.
- Gerber, S., Chabrier, P., Kremer, A. 2003. FAMOZ: a software for parentage analysis using dominant, codominant, and uniparentally inherited markers. *Mol. Ecol. Notes.*, 3, 479 – 481.
- Guerin, J., Sedgley, M. 2007. Cross-pollination in Olive Cultivars, Rural Industries Research and Development Corporation, 11 – 13 str.
- Kump, B., Svetek, S., Javornik, B. 1992. Izolacija visokomolekularne DNK iz rastlinskih tkiv. Zbornik Biotehniške fakultete. Univerza v Ljubljani, 59, 63 – 66.
- Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk, L., Pemberton, J.M. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.*, 7, 639 – 655.
- Matešič, S. 2009. Spremljanje cvetenja različnih sort oljk (*Olea europaea* L.), Diplomsko delo, Ljubljana, 17 – 23 str.

- Minch, E. 1997. Microsat, Version 1.5b: Stanford University Medical center, Stanford.
- Rohlf, F.J. 1998. NTSYS: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.02. Applied Biostatistics Inc., Setauket, New York (programska oprema).
- Sefc, K.M., Lopes, M.S., Mendonca, D., Rodriguez dos Santos, M., Laimer da Camara Machado, M., da Camara Machado, A. 2000. Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea* L.) and their characterisation in Italian and Iberian olive trees. *Mol. Ecol.*, 9, 1171 – 1193.
- Šuštar-Vozlič, J., Javornik, B. 1999. Genetic relationship in cultivars in hop, *Humulus lupulus* L., determined by RAPD analysis. *Plant Breeding*, 118, 175 – 181.
- Vergari, G., Patumi, M., Bartolozzi, F., Fontanazza, G. 1998. Utilizzo di marcatori RAPD per la discriminazione di varietà di olivo appartenenti alla popolazione varietale di 'Frantoio'. *Olivae*, 73, 31 – 36.