



Zaključno poročilo o rezultatih raziskovalnega projekta

Zadnja sprememba: 16. 08. 2022 11:05:33

A. Podatki o raziskovalnem projektu

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra in naziv	V4-1806 - Vzpostavitev sistema uporabe DNA markerjev za genetsko identifikacijo pri preverjanju sortne pristnosti in čistosti pomembnejših vrst žit in križnic kot osnova za kakovostno pridelavo semenskih posevkov ter varno in kakovostno pridelano hrano in krmo
Vodja	5667 - Vladimir Meglič
Naziv težišča v okviru CRP	1.3.1 - Vzpostavitev sistema uporabe DNA markerjev za genetsko identifikacijo pri preverjanju sortne pristnosti in čistosti pomembnejših vrst žit in križnic kot osnova za kakovostno pridelavo semenskih posevkov ter varno in kakovostno pridelano hrano in krmo
Obseg učinkovitih ur raziskovalnega dela	844
Cenovna kategorija	C
Obdobje trajanja	od 1. 11. 2018 do 31. 10. 2021
Nosilna raziskovalna organizacija	401 - Kmetijski inštitut Slovenije
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
Raziskovalno področje po šifrantu FORD	4 - Kmetijske vede 4.01 - Kmetijstvo, gozdarstvo in ribištvo

2. Sofinancerji

Naziv, naslov in pooblaščen predstavnik sofinancerja (Name, address and beneficiary-authorized representative) Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehra

Matična številka (Co. reg. no.) Dunajska cesta 22, 1000 Ljubljana

DODAJ

B. Rezultati in dosežki raziskovalnega projekta

3. Povzetek raziskovalnega projekta

SLO

Sortna pristnost in kakovostno seme sort, ki so prilagojene slovenskim pridelovalnim razmeram, sta ključnega pomena za uspešno kmetijsko pridelavo in posledično za zagotavljanje prehranske varnosti in zmanjšanje tveganja v kmetijski pridelavi. Novejša pravila mednarodne zveze za testiranje semena ISTA (International Seed Testing Association) uvajajo bolj zanesljive postopke določitve sortne pristnosti, ki temeljijo na uporabi DNA markerjev. V okviru delovne skupine OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) Seed Schemes je bila Služba za uradno potrjevanje semenskega in sadilnega materiala kmetijskih rastlin (SUP) na Kmetijskem inštitutu Slovenije kot slovenski certifikacijski organ pozvana, da se opredeli glede izvajanja biokemičnih in molekularnih analiz za preverjanje sortne čistosti, identifikacije ter hibridizacije znotraj posameznih rastlinskih vrst, za katere bi lahko izvajali analize. Tudi s te strani je močan poudarek na aplikaciji DNA markerjev na račun opuščanja analiz na osnovi biokemičnih markerjev. V okviru projekta smo vzpostavili sistem zanesljive identifikacije sort žit in križnic s pomočjo DNA markerjev, kar nam omogoča hitro in učinkovito ter finančno sprejemljivo preverjanje sortne pristnosti in čistosti tako v postopku uradnega potrjevanja semena žit in križnic, kakor tudi v sami pridelavi. Vzpostavljene protokole ter sortno/vrstno specifične DNA markerje je mogoče uporabljati tudi za določanje pristnosti lokalnih sort ter pri nadzoru varne hrane, saj lahko na podlagi testov ciljno primerjamo posejane sorte žit s tistimi v skladišču oziroma specifično moko. Metode smo validirali na dejanskih vzorcih, ki so bili v analizo posredovani na KIS/SUP in smo jih razvrstili v naslednje sklope: ločevanje navadnega in golega ovsa; ločevanje pšenice, pira in tritikale; ločevanje oljne ogrščice in oljne repice; identifikacija netipičnih rastlin znotraj semenskega posevka ječmena; identifikacija netipičnih rastlin v semenskem posevku navadne ajde. Prav tako smo vzpostavili na nacionalnem nivoju krovni dokument, ki metodološko opredeljuje postopke identifikacije sort žit in križnic ter baze podatkov z genskimi profili sort/frekvencami alelov, ki so v Sloveniji vpisane v sortno listo ali se njihov material uradno potrjuje.

4. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela oz. ciljev raziskovalnega projekta

Sortna pristnost in kakovostno seme sort, ki so prilagojene slovenskim pridelovalnim razmeram, sta ključnega pomena za uspešno kmetijsko pridelavo in posledično za zagotavljanje prehranske varnosti in zmanjšanje tveganja v kmetijski pridelavi. Novejša pravila mednarodne zveze za testiranje semena ISTA (International Seed Testing Association) uvajajo bolj zanesljive postopke določitve sorte pristnosti, ki temeljijo na uporabi DNA markerjev. V okviru delovne skupine OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) Seed Schemes je bila Služba za uradno potrjevanje semenskega in sadilnega materiala kmetijskih rastlin (SUP) na Kmetijskem inštitutu Slovenije kot slovenski certifikacijski organ pozvana, da se opredeli glede izvajanja biokemičnih in molekularnih analiz za preverjanje sorte čistosti, identifikacije ter hibridizacije znotraj posameznih rastlinskih vrst, za katere bi lahko izvajali analize. Tudi s te strani je močan poudarek na aplikaciji DNA markerjev na račun opuščanja analiz na osnovi biokemičnih markerjev. V zadnjem obdobju si žlahtnitelji vse bolj prizadevajo, da bi imela vsaka sorta ob svojem opisu predpisano tudi metodiko genetske identifikacije ter dostopen genetski profil določenih lokusov v genomu, na podlagi katerih se sorte med seboj zanesljivo in učinkovito loči. Posledično se v smislu zaščite žlahtniteljskih pravic žlahtnitelji vedno bolj poslužujejo uporabe novih zanesljivih metod, ki sorte med seboj učinkovito ločijo, z uporabo DNA markerjev. V praksi se tudi pri potrjevanju semenskih posevkov tekom vegetacije pojavlja problem identifikacije sort netipičnih rastlin, predvsem v posevkih žit in križnic. Uporabnost genetske identifikacije sort se kaže pri analizah kakovosti semena v laboratoriju, ko se na osnovi morfoloških znakov semena pri analizi čistote in klic v postopku kalivosti pojavlja sum na drugo sorto, vrsto ali celo rod. Nove sorte so si namreč vedno bolj morfološko podobne zato je njihova identifikacija na osnovi vidnih znakov vedno težja. Pri določenih vrstah kmetijskih rastlin je identifikacija ter ugotavljanje dovoljenega deleža netipičnih rastlin in rastlin druge sorte, vrste ali celo rodu na podlagi morfoloških lastnosti nezanesljiva in v postopku uradnega potrjevanja semenskih posevkov in partij semena kmetijskih rastlin predstavlja velik problem. Identifikacija na podlagi vizualnih znakov je posebej problematična pri določenih vrstah žit ter križnic. Z modernimi tehnikami, ki omogočajo analizo rastlinskega materiala na nivoju genoma, lahko hitro in učinkovito preverimo sortno pristnost in čistost semena, preden bi bilo seme dano na trg. V okviru mednarodnih organizacij (OECD, ISTA, UPOV) poteka razprava o možnostih uvedbe teh modernih tehnik v uradne postopke, sodelujoče države pa naj bi v ta namen čim prej začele z vzpostavljanjem podatkovne baze genetskih profilov za sorte, ki jih preverjajo v uradnih postopkih. Sistem zanesljive identifikacije rodu/vrste/sorte z uporabo DNA markerjev metodološko do sedaj še ni bil vpeljan, zato se je pojavila potreba po vzpostavitvi zanesljivega in učinkovitega sistema za genetsko identifikacijo predvsem pri določenih vrstah žit in križnic, ki se v Sloveniji pridelujejo oziroma uradno potrjujejo. Ključnega pomena pri tem je pridobitev genetskih informacij za vzpostavitev primerne baze podatkov zlasti tistih sort, ki so v Sloveniji vpisane v sortno listo ali se njihov material prideluje (uradno potrjuje) v Sloveniji. Predvideti je treba izmenjavo teh podatkov z drugimi državami članicami oz. njihovimi uradnimi organi, zato je potrebno pri razvoju sistema upoštevati tudi priporočila mednarodnih organizacij, zlasti OECD. Za namene izvedbe projektnih aktivnosti smo najprej oblikovali sezname sort, ki smo jih po pregledu veljavne SLO sortne liste in semenske pridelave preko uradnih standardnih vzorcev vključili v CRP, vključno s podatkom o tem, katero vrsto standardnega vzorca že hranimo. Skupno smo v projekt vključili 54 sort žit in križnic. V analizah, ki so bile izvedene v ISTA akreditiranem Semenskem laboratoriju KIS smo za vsako sorto opravili analizo kakovosti semena (določili čistoto in kalivost) po veljavnih ISTA protokolih. Na podlagi morfologije semena smo oblikovali podskupine, v primeru da se je seme iste sorte med seboj morfološko razlikovalo. Seme in mlade rastline vsake sorte smo tudi fotografirali. Po končnih analizah v semenskem laboratoriju smo mlade rastline odnesli v Genetski laboratorij KIS za analize z DNA markerji. Vsaka izmed 54-ih sort je bila v genotipizaciji zastopana s 4-imi (za samoprašne rastlinske vrste) ali z 8-imi (za tujeprašne rastlinske vrste) individualnimi rastlinami, da smo lahko pridobili tudi informacijo o variabilnosti znotraj sorte in frekvencah alelov. Skupno smo v analize vključili 277 vzorcev. Sledila je optimizacija ekstrakcije DNA za vsak sklop rastlinske vrste posebej. Preizkusili smo 6 različnih protokolov ekstrakcije DNA, odvisno od vrste pa smo uporabili tri različne protokole (ekstrakcija z uporabo treh komercialnih kitov in/ali uporaba avtomatiziranega sistema za ekstrakcijo nukleinskih kislin). Nadalje smo za namene genomsko-specifičnega in sortnega ločevanja znotraj/med vrstami žit in križnic na podlagi podatkovnih baz ter znanstvenih člankov identificirali 46 različnih DNA markerjev, ki vključujejo 3 različne markerske sisteme; 43 tipa SSR (angl. Short Seguece Repeat), 2 tipa SCAR (angl. Sequence Characterized Amplified Region) in enega tipa CAPS (angl. Cleaved Amplified Polymorphic Sequences). Za razločevanje znotraj kompleksa vrst pšenica/rž/tritikala/pira smo uporabili 13 DNA markerjev; za razločevanje znotraj rodu Avena 7 DNA markerjev; za razločevanje znotraj rodu Hordeum 6 DNA markerjev; za raznolikost in razločevanje znotraj in med navadno in tatarsko ajdo 11 DNA markerjev; za raznolikost in razločevanje znotraj in med vrstami družine Brassicaceae pa 9 DNA markerjev. Za vsak marker posebej smo optimizirali reakcijske mešanice in pogoje namnoževanja v verižni reakciji s polimerazo (PCR) ter v fragmentni analizi za pridobitev kvalitativnega (prisotnost/odsotnost namnožka na posameznem lokusu) in kvantitativnega (alelna) profila sorte. Rezultati fragmentne analize z alelnimi profili sorte v obliki kodominantnih matrik so zahtevali dodatno obdelavo s statističnimi programi in orodji populacijske genetike za pridobitev informacije o frekvencah alelov in intra-specifične raznolikosti znotraj posamezne sorte. Rezultati bodo del obsežnega metodološkega dokumenta, ki ga pripravljamo. V projektu smo empirično določili tudi meje detekcije, torej najmanjši možni delež, ki dejansko predstavlja prisotnost netipičnih rastlin v združenem vzorcu/posevku in smo ga s standardnim PCR na kvalitativnem nivoju sposobni določiti. Ugotovili smo, da na kvalitativnem nivoju lahko detektiramo že zelo majhne razlike v genomu za posamezen marker, če le-te obstajajo. Vsak izmed specifičnih SSR markerjev, za katere smo določili, da na nivoju detekcije namnožka na gelu/kvalitativne detekcije, uspešno razločujejo med starši in križanci pri stopnji 1% deleža netipičnih rastlin. Če bi želeli določiti razlike v nižjih deležih netipičnih rastlin (torej 0,1% in/ali 0,3% po shemi za različne kategorije certificiranega semena) bi morali analizo nadaljevati na nivoju alelne detekcije (dražja in časovno ter metodološko bolj zahtevna analiza), ki določi razlike med genotipi na en bazni par natančno, kar je optimalno in popolnoma zanesljivo. Na podlagi kvantitativnih rezultatov smo izrisali tudi filogenetsko drevo, ki nam kaže, da smo na kvalitativnem nivoju sposobni ločevati tudi deleže netipičnih rastlin, ki so nižji od 1%, vendar z nižjo zanesljivostjo. Glavni cilj projekta je bil dosežen. Vzpostavili smo sistem zanesljive identifikacije sort žit in križnic s pomočjo DNA markerjev, kar nam omogoča hitro in učinkovito ter finančno sprejemljivo preverjanje sorte pristnosti in čistosti tako v postopku uradnega potrjevanja semena žit in križnic, kakor tudi v sami pridelavi. Vzpostavljene protokole ter sortno/vrstno specifične DNA markerje je mogoče uporabljati tudi za določanje pristnosti lokalnih sort ter pri nadzoru varne hrane, saj lahko na podlagi testov ciljno primerjamo posejane sorte žit s tistimi v skladišču oziroma specifično moko. Metode smo validirali na dejanskih vzorcih, ki so bili v analizo posredovani na KIS/SUP in smo jih razvrstili v naslednje sklope: ločevanje navadnega in golega ovsa; ločevanje pšenice, pira in tritikale; ločevanje oljne ogrščice in oljne repice; identifikacija netipičnih rastlin znotraj semenskega posevka ječmena; identifikacija netipičnih rastlin v semenskem posevku navadne ajde. Prav tako smo vzpostavili na nacionalnem nivoju krovni dokument, ki metodološko opredeljuje postopke identifikacije sort žit in križnic ter baze podatkov z genskimi profili sort/frekvencami alelov, ki so v Sloveniji vpisane v sortno listo ali se njihov material uradno potrjuje. Ta dokument bo v tiskani obliki širši javnosti in vsem zainteresiranim na voljo do poletja 2022. Na podlagi podatkov v omenjenem dokumentu bomo lahko v Genetskem laboratoriju na KIS hitro in zanesljivo izvedli genetske analize, ki bodo učinkovito odpravile dvom o sortni pristnosti in čistosti, tako za potrebe certifikacijskega organa (v skladu s priporočili OECD), kakor tudi za potrebe ISTA akreditiranega laboratorija, inšpekcijske službe, UVVHR-ja, MKGP-ja ter tudi pridelovalcev, uvoznikov semena in žlahtniteljev.

5. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem projektu in zastavljenih raziskovalnih ciljev

Glavni doseženi cilj projekta je bil, da smo uspešno vzpostavili sistem zanesljive identifikacije žit in križnic s pomočjo DNA markerjev, kar sedaj omogoča hitro in učinkovito ter finančno sprejemljivo preverjanje sorte pristnosti in čistosti tako v postopku uradnega potrjevanja semena žit in križnic, kakor tudi pri pridelavi. Ugotovili smo, da na kvalitativnem nivoju lahko detektiramo že zelo majhne razlike v genomu za posamezen marker, če le-te obstajajo. Za vsakega izmed specifičnih SSR markerjev, za katere smo določili, da na nivoju detekcije namnožka na gelu/kvalitativne detekcije z gotovostjo uspešno razločujejo med starši in križanci pri stopnji 1% deleža netipičnih rastlin. Če bi želeli določiti razlike v nižjih deležih netipičnih rastlin (torej 0,1% in/ali 0,3% po shemi za različne kategorije certificiranega semena) bi morali analizo nadaljevati na nivo alelne detekcije (dražja in časovno ter metodološko bolj zahtevna), ki pa določi razlike med genotipi na en bazni par natančno, kar je optimalno in popolnoma zanesljivo. Vzpostavljene protokole ter sortno/vrstno specifične DNA markerje je mogoče uporabljati tudi pri določanju pristnosti lokalnih sort ter pri nadzoru varne hrane, saj lahko na podlagi testov ciljno primerjamo posejane sorte žit s tistimi v skladišču oziroma v moki. Metode v projektu smo namreč tudi ciljno validirali z uporabo na dejanskih vzorcih, ki so bili v analizo posredovani na KIS/SUP za naslednje sklope: ločevanje navadnega in golega ovsa; ločevanje pšenice, pira in tritikale; ločevanje oljne ogrščice in oljne repice; identifikacija netipičnih rastlin znotraj semenskega posevka ječmena; identifikacija netipičnih rastlin znotraj semenskega posevka navadne ajde. Prav tako smo na nacionalnem nivoju vzpostavili krovni dokument, ki metodološko opredeljuje postopke identifikacije sort žit in križnic ter baze podatkov z genskimi profili sort/frekvencami alelov, ki so v Sloveniji vpisane v sortno listo ali se njihov material uradno potrjuje. Ta dokument bo v tiskani obliki širši javnosti in vsem zainteresiranim na voljo do poletja 2022. Na podlagi podatkov v omenjenem dokumentu bomo v Genetskem laboratoriju na KIS sedaj lahko hitro in zanesljivo izvedli genetske analize, ki bodo učinkovito odpravile dvom o sortni pristnosti in čistosti tako za potrebe certifikacijskega organa (v skladu s priporočili OECD), kakor tudi za potrebe ISTA akreditiranega laboratorija, inšpekcijske službe, UVVHR-ja, MKGP-ja ter tudi pridelovalcev, uvoznikov semena in žlahtniteljev samih.

6. Spremembe programa dela raziskovalnega projekta oziroma spremembe sestave projektne skupine

Ni sprememb.

7. Najpomembnejši dosežki projektne skupine na raziskovalnem področju

Naslov (Title) SLO

Uporaba DNA markerjev za genetsko diferenciacijo navadnega in golega ovsca (*Avena sativa* L. in *Avena nuda* L.)

Naslov (Title) EN

The use of DNA markers for genetic differentiation of common (*Avena sativa* L.) and naked oat (*Avena nuda* L.)

Opis (Description) SLO

V članku smo predstavili nova spoznanja pri uporabi DNA markerjev za genetsko identifikacijo navadnega in golega ovsca.

Opis (Description) EN

The article presents new information for genetic identification of common and naked oat using DNA markers.

Objavljeno v (Published in)

Participating institutions from Bulgaria, Croatia, Czech Republic, Hungary, Poland, Romania, Slovakia and Slovenia; Journal of Central European Agriculture; 2021; Vol. 22, no. 2; str. 329-340; Avtorji/Authors: Pipan Barbara, Sinkovič Lovro, Rutar Romana, Meglič Vladimir;

COBISS ID

68663811

Leto

2021

Tipologija (Tipology)

1.01 - Izvirni znanstveni članek (Original Scientific Article)

8. Najpomembnejši dosežek projektne skupine na področju gospodarstva, družbenih in kulturnih dejavnost

Naslov (Title) SLO

Metode, postopki in rezultati preverjanja sortne pristnosti žit in križnic

Naslov (Title) EN

Methods, procedures and results of checking the varietal authenticity of cereals and hybrids

Opis (Description) SLO

V tem dokumentu so predstavljene metode, postopki in najpomembnejši rezultati preverjanja sortne pristnosti pomembnejših vrst žit in križnic z vidika preverjanja kakovosti semena ter na genetskem nivoju z uporabo DNA markerjev. Skupno smo v projektu analizirali 53 sort, kar je pomenilo analizo 403 genotipov žit in križnic. V genetski analizi smo uporabili 46 različnih DNA markerjev, ki vključujejo 3 različne markerske sisteme: 43 tipa SSR (angl. Short Sequence Repeat), 2 tipa SCAR (angl. Sequence Characterized Amplified Region) in enega tipa CAPS (angl. Cleaved Amplified Polymorphic Sequences).

Opis (Description) EN

This document presents the methods, procedures and most important results of checking the varietal authenticity of the most important types of cereals and hybrids from the point of view of checking the quality of the seed and at the genetic level using DNA markers. In total, we analyzed 53 varieties in the project, which meant the analysis of 403 genotypes of cereals and hybrids. In the genetic analysis, we used 46 different DNA markers, which include 3 different marker systems: 43 SSR (Short Sequence Repeat) types, 2 SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) types and one CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) type).

Objavljeno v (Published in)

Kmetijski inštitut Slovenije; 2022; 62 str.; Avtorji/Authors: Pipan Barbara, Rutar Romana, Vouk Darja, Sinkovič Lovro, Krpan Teja, Fortuna Mateja, Meglič Vladimir;

Šifra

F.14 - Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih

COBISS ID

113037571

Leto

2022

Tipologija (Tipology)

2.06 - Slovar, enciklopedija, leksikon, priročnik, atlas, zemljevid (Dictiona

Naslov (Title) SLO

Vzpostavitev sistema uporabe DNA markerjev za genetsko identifikacijo pri preverjanju sortne prisotnosti in čistosti pomembnejših vrst žit in križnic kot osnova za kakovostno pridelavo semenskih posevkov ter varno in kakovostno pridelano hrano in krmo

Naslov (Title) EN

Establishing a system of using DNA markers for genetic identification in checking the varietal presence and purity of the most important types of cereals and hybrids as a basis for high-quality production of seed crops and safe and high-quality food and fodder

Opis (Description) SLO

Predstavitev vzpostavitve sistema uporabe DNA markerjev za genetsko identifikacijo pri preverjanju sortne pristnosti in čistosti pomembnejših vrst žit in križnic kot osnova za kakovostno pridelavo semenskih posevkov ter varno in kakovostno pridelano hrano in krmo na Kmetijskem inštitutu Slovenije.

Opis (Description) EN

Description of a new system of using DNA markers for genetic identification in checking the varietal authenticity and purity of important types of cereals and hybrids as a basis for high-quality production of seed crops and safe and high-quality food and fodder.

Objavljeno v (Published in)

2019; Avtorji/Authors: Pipan Barbara, Rutar Romana, Benec Uroš, Meglič Vladimir;

Šifra

F.17 - Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso

COBISS ID

5779816

Leto

2019

Tipologija (Tipology)

3.16 - Vabljen predavanje na konferenci brez natisa (Unpublished Invite

Naslov (Title) SLO

V4-1806 CRP sortnost

Naslov (Title) EN

V4-1806 CRP sortnost

Opis (Description) SLO

Predstavitev CRP projekta na 59. mednarodnem sejmu AGRA v Gornji Radgoni.

Opis (Description) EN

Presentation of the CRP project at the 59th International fair AGRA in Gornja Radgona.

Objavljeno v (Published in)

2021; Avtorji/Authors: Pipan Barbara, Sinkovič Lovro, Dolničar Peter, Meglič Vladimir;

Šifra

F.18 - Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi,

COBISS ID

76361731

Leto

2021

Tipologija (Typology)

3.15 - Prispevek na konferenci brez natisa (Unpublished Conference Cor

Naslov (Title) SLO

Vzpostavitev sistema uporabe DNA markerjev za genetsko identifikacijo pri preverjanju sortne pristnosti in čistosti pomembnejših vrst žit in križnic kot osnova za kakovostno pridelavo semenskih posevkov ter varno in kakovostno pridelano hrano in krmo

Naslov (Title) EN

Establishing a system of using DNA markers for genetic identification in checking the varietal presence and purity of the most important types of cereals and hybrids as a basis for high-quality production of seed crops and safe and high-quality food and fodder

Opis (Description) SLO

Predstavitev vzpostavitve sistema uporabe DNA markerjev za genetsko identifikacijo pri preverjanju sortne pristnosti in čistosti pomembnejših vrst žit in križnic kot osnova za kakovostno pridelavo semenskih posevkov ter varno in kakovostno pridelano hrano in krmo na Kmetijskem inštitutu Slovenije strokovni in lični publikli.

Opis (Description) EN

Description of a new system of using DNA markers for genetic identification in checking the varietal authenticity and purity of important types of cereals and hybrids as a basis for high-quality production of seed crops and safe and high-quality food and fodder to the agricultural professionals.

Objavljeno v (Published in)

2019; Avtorji/Authors: Meglič Vladimir, Rutar Romana, Pipan Barbara;

Šifra

F.01 - Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin

COBISS ID

5737064

Leto

2019

Tipologija (Typology)

3.16 - Vabljen predavanje na konferenci brez natisa (Unpublished Invite

9. Drugi pomembni rezultati projektne skupine

-

10. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine

10.1. Pomen za razvoj znanosti

SLO

Sortna pristnost in kakovostno seme sort, ki so prilagojene slovenskim pridelovalnim razmeram, sta ključnega pomena za uspešno kmetijsko pridelavo in posledično za zagotavljanje prehranske varnosti in zmanjšanje tveganja v kmetijski pridelavi. Ugotavljanje sortne pristnosti in čistosti sta bistvena elementa poljskih pregledov. Rezultati ocene teh dveh parametrov pomembno vplivajo na končno vzgojno stopnjo - kategorijo, v katero bo potrjen semenski posevek. Nova pravila mednarodne zveze za testiranje semena ISTA (angl. International Seed Testing Association) uvajajo bolj zanesljive postopke določitve sortne pristnosti, ki temeljijo na uporabi DNA markerjev. V splošnem je pri različnih vrstah najbolj široko uporabljeno molekularsko orodje prav aplikacija SSR markerjev, za določene rastlinske vrste pa je v fazi uvajanja tudi genotipizacija z uporabo še preciznejših SNP (Single Nucleotide Polymorphism) markerjev. V zadnjem obdobju si žlahtnitelji vse bolj prizadevajo, da bi imela vsaka sorta ob svojem opisu predpisano metodiko genetske identifikacije ter dostopen genetski profil določenih lokusov v genomu, na podlagi katerih se sorte med seboj zanesljivo in učinkovito loči. Posledično se v smislu zaščite žlahtniteljskih pravic (angl. breeders rights) žlahtnitelji vedno bolj poslužujejo novih oz. zanesljivih metod, ki sorte med seboj učinkovito ločijo in to je z uporabo DNA markerjev. Prav tako se tudi pri potrjevanju semenskih posevkov tekom vegetacije pojavlja problem identifikacije netipičnih rastlin predvsem pri žitih in križnicah. Enaka problematika se pojavlja tekom analiz kakovosti semena v laboratoriju, ko se na osnovi morfoloških znakov semena pri analizi čistote in klic v postopku kalivosti pojavlja sum na drugo sorto, vrsto ali celo rod. Nabor rastlinskih vrst, ki so bile predmet tega CRP, so sorte agronomsko pomembnih vrst žit in križnic, ki so vpisane na slovenski ali evropski sortni listi, njihov material pa se prideluje ali uradno potrjuje v Sloveniji. Poleg tega je nabor vključeval tudi vrste, ki jih je na nivoju fenotipa in morfoloških karakteristik semena, klic ali rastlin v semenski pridelavi težko identificirati in razločevati (npr. nekatere križnice kot so Brassica rapa (repa/oljna repica); Sinapis arvensis L. (njivska gorjušica); in vrste ovsava Avena sativa L. (navadni oves); Avena nuda L. (goli oves); itd). Izbor sort/vrst/rodov, ki so bile vključene v projekt, smo pripravili v začetni fazi izvajanja projekta in je bil orientiran glede na zgoraj naštetje kriterije. Za rastlinske rodove in vrste iz skupin žit in križnic v literaturi obstajajo različni tipi DNA markerjev, odvisno od informativnosti, uporabnosti in zanesljivosti markerskega sistema za posamezno rastlinsko vrsto. Rezultati projekta podajajo vpogled v splošno raznolikost sort znotraj skupine žit ter med sortami znotraj skupine križnic. Na podlagi aplikacije različnih DNA markerjev, ki so povezani z ločevanjem posameznih genomov znotraj sort in med sortami smo pridobili informacijo tudi o genomskih regijah, na podlagi katerih se posamezne sorte med seboj razlikujejo, kar bo pripomoglo k študiju genoma tudi z uporabo tehnologij sekvenciranja naslednje generacije (NGS). Rezultati projekta so bili predstavljeni na številnih strokovnih sestankih in srečanjih ter na znanstvenih konferencah in simpozijih. Pomembno je izpostaviti znanstveni dosežek projekta, izvirni znanstveni članek o uporabi DNA markerjev za genetsko identifikacijo golega in navadnega ovsava ter raziskovalno delo dijakinje tehniške gimnazije BIC z naslovom »Uporaba DNA markerjev za določanje deleža netipičnih rastlin v semenskih posevkih navadne pšenice (Triticum aestivum L.)« in je prejelo Krkino priznanje 2021 v sklopu natečaja 51. Krkinih nagrad (mentorica dr. Barbara Pipan).

ANG

Varietal authenticity and high-quality seed of varieties that are adapted to Slovenian growing conditions are crucial for successful agricultural production and, consequently, for ensuring food security and reducing risks in agricultural production. Determining varietal authenticity and purity are essential elements of field inspections. The results of the assessment of these two parameters significantly affect the final breeding stage - the category into which the seed crop will be confirmed. The new rules of the International Seed Testing Association (ISTA) introduce more reliable procedures for determining varietal authenticity based on the use of DNA markers. In general, the most widely used molecular tool for various species is the application of SSR markers, and for certain plant species genotyping using even more precise SNP (Single Nucleotide Polymorphism) markers is also in the phase of introduction. In the recent period, breeders are increasingly striving to ensure that each variety has a prescribed genetic identification methodology along with its description, as well as an accessible genetic profile of certain loci in the genome, based on which the varieties can be reliably and effectively separated from each other. As a result, in terms of protecting breeders' rights, breeders are increasingly using new or reliable methods that effectively separate the varieties from each other, and that is with the use of DNA markers. Also, when confirming

seed production during the growing season, the problem of identifying atypical plants arises, especially in the case of cereals and cruciferous vegetables. The same problem arises during the analysis of seed quality in the laboratory, when based on the morphological characteristics of the seed during the analysis of purity and germination, a suspicion of another variety, species or even genus arises. The set of plant species that were the subject of this CRP are varieties of agronomically important types of cereals and crucifers, which are entered on Slovenian or European variety lists, and their material is grown or officially certified in Slovenia. In addition, the set also included species that are difficult to identify and distinguish at the level of phenotype and morphological characteristics of seeds, seedlings, or plants in seed production (e.g., some crucifers such as *Brassica rapa* (turnip/canola); *Sinapis arvensis* L. (field mustard); and oat species *Avena sativa* L. (common oats); *Avena nuda* L. (bare oats); etc). Different types of DNA markers exist in the literature for plant genera and species from the groups of cereals and crucifers, depending on the informativeness, usefulness and reliability of the marker system for each plant species. The results of the project provide insight into the general diversity of varieties within the cereal group and between varieties within the cruciferous group. Based on the application of various DNA markers, which are related to the separation of individual genomes within varieties and between varieties, we also obtained information about the genomic regions based on which individual varieties differ from each other, which will help the study of the genome also using next-generation sequencing technologies (NGS). The results of the project were presented at numerous professional meetings and gatherings as well as at scientific conferences and symposia. It is important to point out the scientific achievement of the project, the original scientific article on the use of DNA markers for the genetic identification of naked and common oats, and the research work of BIC technical high school students entitled "The use of DNA markers to determine the proportion of atypical plants in seed crops of common wheat (*Triticum aestivum* L.)" and received Krka's award 2021 as part of the 51st Krka Awards competition (mentor Dr. Barbara Pipan).

10.2. Pomen za razvoj Slovenije

SLO

Pomen same sorte je zajet v Zakonu o varstvu novih sort rastlin (ZVNSR). Trenutno se na nacionalnem nivoju v sklopu različnih vsebin (uradno potrjevanje posevkov ...) oceno sortne čistosti in pristnosti opravlja z vizualnimi pregledi posevkov na polju. Raziskave na področju uporabe molekularnih tehnik v postopkih certificiranja so zato širše uporabljene in pomagajo predvsem k vzpostavitvi naprednih dopolnilnih tehnik za določanje sortne pristnosti in čistosti tako v Sloveniji kakor tudi širše. Cilj projekta je bil de novo razviti protokole ter vzpostaviti metode, ki jasno definirajo pot uporabe molekularnih tehnik v certificaciji žit in križnic. Rezultati projekta sedaj predstavljajo osnovo za pripravo oziroma dopolnitev baz podatkov z opisi sort, saj so na voljo tudi genetske informacije, ki so bile pridobljene po predpisanih in dokazano ponovljivih protokolih. Glavni cilj projekta je bil dosežen. Uspešno smo vzpostavili sistem zanesljive identifikacije s pomočjo DNA markerjev, kar omogoča hitro in učinkovito ter finančno sprejemljivo preverjanje sortne pristnosti in čistosti tako v postopku uradnega potrjevanja semena žit in križnic, kakor tudi pri pridelavi. Prav tako smo na nacionalnem nivoju pripravili krovni dokument, ki metodološko opredeljuje postopke identifikacije sort ter baze podatkov z genskimi profili sort, ki so v Sloveniji vpisane v sortno listo ali se njihov material uradno potrjuje. Na osnovi tega bomo v genetskem laboratoriju KIS lahko hitro in zanesljivo izvedli genetske analize, ki bodo učinkovito odpravile dvom o sortni pristnosti in čistosti tako za potrebe certifikacijskega organa (v skladu s priporočili OECD), kakor tudi za potrebe ISTA akreditiranega laboratorija, inšpekcijske službe, UVVHR-ja, MKGP-ja ter pridelovalcev, uvoznikov semena in tudi žlahtniteljev samih. Vzpostavljene protokole ter sortno/vrstno specifične DNA markerje je mogoče uporabljati tudi pri določanju pristnosti lokalnih sort ter pri nadzoru varne hrane, saj lahko na podlagi testov ciljno primerjali posejane sorte žit s tistimi v skladišču oziroma v moki. V projektu smo empirično določili tudi meje detekcije, torej najmanjši možni delež, ki dejansko predstavlja prisotnost netipičnih rastlin v združenem vzorcu/posevku in smo ga s standardnim PCR na kvalitativnem nivoju sposobni določiti. Pridelava semen, tako poljščin kakor tudi vrtnin, je pomembna panoga znotraj kmetijstva. Prav tako pa je pomembna tudi trgovina s semeni, ki je vpeta v mednarodni prostor. Trg s semeni hitro narašča, zato postaja ključno vprašanje kako z minimalnimi vložki zagotoviti kakovosten nadzor nad semenom, oziroma njegovo kakovostjo z namenom ohranjanja biotske raznovrstnosti ter varstvom potrošnika. Zagotovo je eden izmed načinov ta, da je potrebno nadzorovati celoten postopek proizvodnje semena, od načrtovanja semenskega posevka, do končnega potrošnika. To lahko storimo le s strokovnostjo, izkušnjami ter vso znanostjo, ki jo imamo na voljo in k temu rezultati projekta V4-1806 bistveno prispevajo. Poleg tega bodo genetske informacije o posameznih sortah, ki so bile vključene v projekt, predstavljale uporabno osnovo pri zakonodaji tudi na področju pridelave in certificiranja ekološkega semena (npr. EU 2018/848; 2021/971). Rezultati projekta v obliki vzpostavljenih metod ter informacij o genetskih profilih sort žit in križnic, ki so na sortni listi, bodo sedaj lahko rutinsko v uporabi v Genetskem laboratoriju KIS za namene pridobivanja odgovorov na zgoraj prisotne dvome in vprašanja.

ANG

The importance of the variety itself is covered by the Act on the Protection of New Plant Varieties (ZVNSR). Currently, at the national level, as part of various contents (official certification of crops...), the assessment of varietal purity and authenticity is carried out by visual inspections of crops in the field. Research in the field of the use of molecular techniques in certification procedures is therefore more widely used and primarily helps to establish advanced complementary techniques for determining varietal authenticity and purity both in Slovenia and beyond. The aim of the project was to develop de novo protocols and establish methods that clearly define the way of using molecular techniques in the certification of cereals and hybrids. The results of the project now represent the basis for the preparation or supplementing of databases with descriptions of varieties, as genetic information is also available, which was obtained according to prescribed and proven repeatable protocols. The main goal of the project was achieved. We have successfully established a system of reliable identification with the help of DNA markers, which enables a quick and efficient and financially acceptable verification of varietal authenticity and purity, both in the process of official certification of cereal and hybrid seeds, as well as during cultivation. We have also prepared an umbrella document at the national level, which methodologically defines the procedures for identification of varieties and databases with genetic profiles of varieties that are entered in the list of varieties in Slovenia or whose material is officially confirmed. Based on this, the KIS genetic laboratory will be able to perform genetic analyses quickly and reliably, which will effectively eliminate doubts about varietal authenticity and purity both for the needs of the certification body (in accordance with OECD recommendations), as well as for the needs of the ISTA accredited laboratory, the inspection service, UVVHR, MKGP and growers, seed importers and breeders themselves. Established protocols and variety/species-specific DNA markers can also be used in determining the authenticity of local varieties and in the control of safe food, since based on tests, it is possible to objectively compare sown varieties of cereals with those in storage or in flour. In the project, we also empirically determined the limits of detection, i.e., the smallest possible proportion that represents the presence of atypical plants in the combined sample/crop, and which we can determine qualitatively using standard PCR. The production of seeds, both crops and vegetables, is an important industry within agriculture. The seed trade, which is embedded in the international space, is also important. The seed market is growing rapidly, so the key question is how to ensure high-quality control over the seed, or its quality with the aim of preserving biodiversity and consumer protection, with minimal inputs. Certainly, one way is to control the entire process of seed production, from the planning of the seed crop to the final consumer. We can only do this with expertise, experience and all the science we have at our disposal, and the results of the V4-1806 project significantly contribute to this. In addition, the genetic information on the individual varieties that were included in the project will represent a useful basis for legislation also in the field of organic seed production and certification (e.g., EU 2018/848; 2021/971). The results of the project in the form of established methods and information on the genetic profiles of cereal varieties and hybrids, which are on the variety list, will now be routinely used in the KIS Genetic Laboratory for the purposes of obtaining answers to the above doubts and questions.

11. Vpetost raziskovalnih rezultatov projektne skupine

11.1. 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?

Rezultati so v prvi vrsti zanimivi in praktično uporabni za SUP KIS, ki izvaja naknadno kontrolo ter certifikacijo semenskega materiala. Preko njih se za naše storitve zanimajo tudi pridelovalci in uvozniki semenskega materiala ter žlahtnitelji (podjetje RGA), ki želijo preveriti čistost/pristnost njihovega žlahtniteljskega in semenskega materiala.

11.2. 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 tujimi raziskovalnimi inštitucijami:

S tujimi inštitucijami še ni bilo sodelovanja.

Kateri so rezultati tovrstnega sodelovanja:

12. Označite, katerega od navedenih ciljev ste si zastavili pri projektu, katere konkretne rezultate ste dosegli in v kakšni meri so doseženi rezultati uporabljeni

Cilj	
F.01	Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin
Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
Rezultat	Dosežen
Uporaba rezultatov	V celoti
F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj
Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
Rezultat	Dosežen
Uporaba rezultatov	Delno
F.03	Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja
Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
Rezultat	Dosežen
Uporaba rezultatov	V celoti
F.04	Dvig tehnološke ravni
Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
Rezultat	Dosežen
Uporaba rezultatov	V celoti
F.05	Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja
Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
Rezultat	Dosežen bo v naslednjih 3 letih
Uporaba rezultatov	Ni uporabljen
F.06	Razvoj novega izdelka
Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
Rezultat	Dosežen bo v naslednjih 3 letih
Uporaba rezultatov	Ni uporabljen
F.07	Izboljšanje obstoječega izdelka
Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
Rezultat	Dosežen bo v naslednjih 3 letih
Uporaba rezultatov	Ni uporabljen
F.08	Razvoj in izdelava prototipa
Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE

Cilj

Rezultat Dosežen bo v naslednjih 3 letih

Uporaba rezultatov Ni uporabljen

F.09 Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije

Zastavljen cilj DA NE

Rezultat Dosežen bo v naslednjih 3 letih

Uporaba rezultatov Ni uporabljen

F.10 Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije

Zastavljen cilj DA NE

Rezultat Dosežen

Uporaba rezultatov V celoti

F.11 Razvoj nove storitve

Zastavljen cilj DA NE

Rezultat Dosežen

Uporaba rezultatov V celoti

F.12 Izboljšanje obstoječe storitve

Zastavljen cilj DA NE

Rezultat Dosežen

Uporaba rezultatov V celoti

F.13 Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov

Zastavljen cilj DA NE

Rezultat Dosežen bo v naslednjih 3 letih

Uporaba rezultatov Ni uporabljen

F.14 Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih

Zastavljen cilj DA NE

Rezultat Dosežen bo v naslednjih 3 letih

Uporaba rezultatov Ni uporabljen

F.15 Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz

Zastavljen cilj DA NE

Rezultat Dosežen bo v naslednjih 3 letih

Uporaba rezultatov Ni uporabljen

F.16 Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz

Zastavljen cilj DA NE

Rezultat Dosežen

Uporaba rezultatov V celoti

F.17 Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso

Zastavljen cilj DA NE

Cilj

Rezultat

Dosežen

Uporaba rezultatov

V celoti

F.18 Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi,

Zastavljen cilj

DA NE

Rezultat

Dosežen

Uporaba rezultatov

V celoti

F.19 Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")

Zastavljen cilj

DA NE

Rezultat

Dosežen bo v naslednjih 3 letih

Uporaba rezultatov

Ni uporabljen

F.20 Ustanovitev novega podjetja ("spin off")

Zastavljen cilj

DA NE

Rezultat

Dosežen bo v naslednjih 3 letih

Uporaba rezultatov

Ni uporabljen

F.21 Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov

Zastavljen cilj

DA NE

Rezultat

Dosežen bo v naslednjih 3 letih

Uporaba rezultatov

Ni uporabljen

F.22 Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov

Zastavljen cilj

DA NE

Rezultat

Ni dosežen

Uporaba rezultatov

Ni uporabljen

F.23 Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev

Zastavljen cilj

DA NE

Rezultat

Dosežen bo v naslednjih 3 letih

Uporaba rezultatov

Ni uporabljen

F.24 Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev

Zastavljen cilj

DA NE

Rezultat

Dosežen bo v naslednjih 3 letih

Uporaba rezultatov

Ni uporabljen

F.25 Razvoj novih organizacijskih in upravljavskih rešitev

Zastavljen cilj

DA NE

Rezultat

Dosežen bo v naslednjih 3 letih

Uporaba rezultatov

Ni uporabljen

F.26 Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev

Zastavljen cilj

DA NE

Cilj

Rezultat Dosežen bo v naslednjih 3 letih

Uporaba rezultatov Ni uporabljen

F.27 Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine

Zastavljen cilj DA NE

Rezultat Dosežen bo v naslednjih 3 letih

Uporaba rezultatov Ni uporabljen

F.28 Priprava/organizacija razstave

Zastavljen cilj DA NE

Rezultat Dosežen bo v naslednjih 3 letih

Uporaba rezultatov Ni uporabljen

F.29 Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete

Zastavljen cilj DA NE

Rezultat Dosežen bo v naslednjih 3 letih

Uporaba rezultatov Ni uporabljen

F.30 Strokovna ocena stanja

Zastavljen cilj DA NE

Rezultat Dosežen

Uporaba rezultatov V celoti

F.31 Razvoj standardov

Zastavljen cilj DA NE

Rezultat Dosežen bo v naslednjih 3 letih

Uporaba rezultatov Ni uporabljen

F.32 Mednarodni patent

Zastavljen cilj DA NE

Rezultat Dosežen bo v naslednjih 3 letih

Uporaba rezultatov Ni uporabljen

F.33 Patent v Sloveniji

Zastavljen cilj DA NE

Rezultat Dosežen bo v naslednjih 3 letih

Uporaba rezultatov Ni uporabljen

F.34 Svetovalna dejavnost

Zastavljen cilj DA NE

Rezultat Dosežen

Uporaba rezultatov V celoti

F.35 Drugo

Zastavljen cilj DA NE

Cilj	
Rezultat	Ni dosežen
Uporaba rezultatov	Ni uporabljen

Komentar

13. Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja

Vpliv		
G.01.	Razvoj visokošolskega izobraževanja	
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/> Ni vpliva <input checked="" type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/> Ni vpliva <input checked="" type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.01.03.	Drugo <input type="text"/>	<input type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.02.	Gospodarski razvoj	
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	<input type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input checked="" type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	<input type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input checked="" type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	<input type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input checked="" type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	<input type="radio"/> Ni vpliva <input checked="" type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	<input type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input checked="" type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	<input type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input checked="" type="radio"/> Velik vpliv
G.02.07.	Večji delež izvoza	<input type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input checked="" type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.02.08.	Povečanje dobička	<input type="radio"/> Ni vpliva <input checked="" type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.02.09.	Nova delovna mesta	<input type="radio"/> Ni vpliva <input checked="" type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	<input type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input checked="" type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.02.11.	Nov investicijski zagon	<input type="radio"/> Ni vpliva <input checked="" type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.02.12.	Drugo <input type="text"/>	<input type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.03.	Tehnološki razvoj	
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti	<input type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input checked="" type="radio"/> Velik vpliv
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti	<input type="radio"/> Ni vpliva <input checked="" type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij	<input type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input checked="" type="radio"/> Velik vpliv
G.03.04.	Drugo <input type="text"/>	<input type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.04.	Družbeni razvoj	
G.04.01	Dvig kvalitete življenja	<input checked="" type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja	<input checked="" type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave	<input type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input checked="" type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti	<input checked="" type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.04.05.	Razvoj civilne družbe	<input checked="" type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.04.06.	Drugo <input type="text"/>	<input type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.05.	Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete	<input type="radio"/> Ni vpliva <input checked="" type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.06.	Varovanje okolja in trajnostni razvoj	<input type="radio"/> Ni vpliva <input checked="" type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv

Vpliv

G.07. Razvoj družbene infrastrukture

G.07.01. Informacijsko-komunikacijska infrastruktura Ni vpliva Majhen vpliv Srednji vpliv Velik vpliv

G.07.02. Prometna infrastruktura Ni vpliva Majhen vpliv Srednji vpliv Velik vpliv

G.07.03. Energetska infrastruktura Ni vpliva Majhen vpliv Srednji vpliv Velik vpliv

G.07.04. Ni vpliva Majhen vpliv Srednji vpliv Velik vpliv

G.08. Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva Ni vpliva Majhen vpliv Srednji vpliv Velik vpliv

G.09. Ni vpliva Majhen vpliv Srednji vpliv Velik vpliv

Komentar

14. Naslov spletne strani za projekte, odobrene na podlagi Javnih razpisov za sofinanciranje ciljnih raziskovalnih projektov za leta 2017, 2018 in 2019

https://www.kis.si/CRP_1/CRP_DNA_1/

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 (v primeru, da poročilo ne bo oddano z digitalnima podpisoma);
- so z vsebino poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta;
- bomo sofinancerjem istočasno z zaključnim poročilom predložili tudi elaborat, ki ga bomo posredovali v digitalni obliki ali po pošti, skladno z zahtevami sofinancerjev.

Potrjujemo zgoraj navedene izjave.

Podpisa:

Zastopnik oz. pooblaščenca oseba

in

Vodja programa/projekta

Andrej Simončič

Digitalno podpisano

Vladimir Meglič

Digitalno podpisano

ŽIG

Datum: 16. 08. 2022

Oznaka obrazca: 11qb-iw4w-oomr-2c4s-057q-57ig-l

METODE, POSTOPKI IN REZULTATI PREVERJANJA SORTNE PRISTNOSTI ŽIT IN KRIŽNIC

CRP V4-1806: Vzpostavitev sistema uporabe DNA markerjev za genetsko identifikacijo pri preverjanju sortne pristnosti in čistosti pomembnejših vrst žit in križnic kot osnova za kakovostno pridelavo semenskih posevkov ter varno in kakovostno pridelano hrano in krmo



METODE, POSTOPKI IN REZULTATI PREVERJANJA SORTNE PRISTNOSTI ŽIT IN KRIŽNIC

CRP V4-1806: Vzpostavitev sistema uporabe DNA markerjev za genetsko identifikacijo pri preverjanju sortne pristnosti in čistosti pomembnejših vrst žit in križnic kot osnova za kakovostno pridelavo semenskih posevkov ter varno in kakovostno pridelano hrano in krmo

Barbara Pipan, Romana Rutar, Darja Vouk, Lovro Sinkovič, Mateja Fortuna, Teja Krpan, Vladimir Meglič

Ljubljana 2022

Izdal in založil

KMETIJSKI INŠTITUT SLOVENIJE

Ljubljana, Hacquetova ulica 17

Direktor prof. dr. Andrej SIMONČIČ

Avtorji in uredniki

dr. Barbara PIPAN

mag. Romana RUTAR

Darja VOUK

dr. Lovro SINKOVIČ

Mateja FORTUNA

Teja KRPAN

izr. prof. dr. Vladimir MEGLIČ

Fotografije

Ana ŠPILAK, Darja VOUK, Aljoša BREGAR, Barbara PIPAN

Pregledala in lektorirala

dr. Andreja Žibrat Gašparič

Ostali notranji in zunanji sodelavci

Uroš Benec, Lili Marinček, mag. Ela Žilič, Aljoša Bregar, Ana Špilak, Maša Zupančič

Oblikovna zasnova naslovnice

AV Studio d.o.o.

Elektronska verzija je dostopna na spletni strani Kmetijskega inštituta Slovenije (www.kis.si)

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani

COBISS.SI-ID 112886019

ISBN 978-961-6998-60-4 (PDF)

Publikacija je nastala v okviru projekta CRP V4-1806, sofinanciranega s strani Javne agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije in Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano. Vsebinsko je bil projekt spremljan s strani Uprave za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	5
2	SPLOŠNI MATERIALI IN POSTOPKI, UPORABLJENI PRI ANALIZAH VSEH VRST ŽIT IN KRIŽNIC.....	6
2.1	PRIJAVA SEZNAMA SORT ŽIT IN KRIŽNIC.....	6
2.2	PRIJAVA TER ANALIZA KAKOVOSTI SEMENA VKLJUČENIH SORT.....	6
2.3	GENETSKA ANALIZA.....	7
2.3.1	<i>Izolacija DNA ter preverjanje kakovosti in količine DNA.....</i>	<i>7</i>
2.3.2	<i>Priprava in izvedba verižne reakcije s polimerazo (PCR).....</i>	<i>8</i>
2.3.3	<i>Kvalitativna obravnava PCR produktov.....</i>	<i>8</i>
2.3.4	<i>Fragmentna analiza in prikaz rezultatov.....</i>	<i>8</i>
3	PŠENICA, PIRA IN RŽ.....	10
3.1	SPECIFIČNI/E MATERIALI IN METODE V ANALIZI.....	10
3.2	REZULTATI ANALIZE KAKOVOSTI SEMENA.....	13
3.3	<i>Rezultati genetske analize.....</i>	<i>18</i>
4	JEČMEN.....	29
4.1	SPECIFIČNI MATERIALI IN METODE V ANALIZI.....	29
4.2	REZULTATI ANALIZE KAKOVOSTI SEMENA.....	30
4.3	REZULTATI GENETSKE ANALIZE.....	32
5	OVES.....	35
5.1	SPECIFIČNI/E MATERIALI IN METODE V ANALIZI.....	35
5.2	REZULTATI ANALIZE KAKOVOSTI SEMENA.....	36
5.3	REZULTATI GENETSKE ANALIZE.....	36
6	AJDA.....	39
6.1	SPECIFIČNI/E MATERIALI IN METODE V ANALIZI.....	39
6.2	REZULTATI ANALIZE KAKOVOSTI SEMENA.....	40
6.3	REZULTATI GENETSKE ANALIZE.....	43
7	KRIŽNICE.....	48
7.1	SPECIFIČNI/E MATERIALI IN METODE V ANALIZI.....	48
7.2	REZULTATI ANALIZE KAKOVOSTI SEMENA.....	49
7.3	REZULTATI GENETSKE ANALIZE.....	55

1 UVOD

Sortna pristnost in kakovostno seme sort, ki so prilagojene slovenskim pridelovalnim razmeram, sta ključnega pomena za uspešno kmetijsko pridelavo in posledično za zagotavljanje prehranske varnosti in zmanjšanje tveganja v kmetijski pridelavi.

Veljavni predpisi o semenskem materialu kmetijskih rastlin določajo kriterije kakovosti, ki jih morajo izpolnjevati partije semena, ki so namenjene trženju. Kakovost semena v širšem pomenu predstavljajo ustrezna sortna pristnost in čistost, kalivost, tehnična čistota semena, vsebnost semena drugih vrst rastlin ter njihovo zdravstveno stanje. Za preverjanje kakovosti se uporabljajo uradno sprejete metode, ki temeljijo na metodah mednarodnih organizacij (International Seed Testing Association - ISTA, Organisation for Economic Co-operation and Development - OECD, International Union for the Protection of New Varieties of Plants - UPOV), na katere se sklicuje slovenska in evropska zakonodaja s področja semenskega materiala kmetijskih rastlin.

Sortna pristnost in čistost se preverjata med rastjo (vizualni pregledi semenskih posevkov), ob analizi kakovosti semena vzorcev, odvzetih od partij semena pred trženjem (pri ugotavljanju kalivosti, čistosti, vsebnosti števila semen drugih vrst rastlin) in z naknadno kontrolo (analiza inšpekcijsko odvzetih vzorcev semena na trgu). Metode preverjanja sortne pristnosti in čistosti semenskih posevkov in vzorcev semena (poljski pregledi, laboratorijski testi) temeljijo na vizualni oceni izraženih morfoloških lastnosti rastlin v semenskih posevkih in na kontrolnem polju, ter na vizualni oceni semena tekom analize čistote in klic tekom testa kalivosti.

Pri določenih vrstah kmetijskih rastlin je identifikacija ter ugotavljanje dovoljenega deleža netipičnih rastlin in rastlin druge sorte, vrste ali celo rodu na podlagi morfoloških lastnosti nezanesljiva in v postopku uradnega potrjevanja semenskih posevkov in partij semena kmetijskih rastlin predstavlja veliko težavo. Identifikacija na podlagi vizualnih znakov je posebej težavna pri določenih vrstah žit in križnic.

Z modernimi tehnikami, ki omogočajo analizo rastlinskega materiala na nivoju genoma, lahko hitro in učinkovito preverimo sortno pristnost in čistost semena, preden bi bilo seme dano na trg. V okviru mednarodnih organizacij (OECD, ISTA, UPOV) poteka razprava o možnostih uvedbe teh modernih tehnik v uradne postopke, sodelujoče države pa naj bi v ta namen čim prej začele z vzpostavljanjem podatkovne baze genetskih profilov za sorte, ki jih preverjajo v uradnih postopkih.

Sistem zanesljive identifikacije rodu/vrste/sorte z uporabo DNA markerjev metodološko do sedaj še ni bil vpeljan, zato se je pojavila potreba po vzpostavitvi zanesljivega in učinkovitega sistema za genetsko identifikacijo predvsem pri določenih vrstah žit in križnic, ki se v Sloveniji pridelujejo oziroma uradno potrjujejo. Ključnega pomena pri tem je pridobitev genetskih informacij za vzpostavitev primerne baze podatkov zlasti tistih sort, ki so v Sloveniji vpisane v sortno listo ali se njihov material (uradno) prideluje v Sloveniji. Predvideti je potrebno izmenjavo teh podatkov z drugimi državami članicami oz. njihovimi uradnimi organi, zato je potrebno pri razvoju sistema upoštevati tudi priporočila mednarodnih organizacij, zlasti OECD.

V tem dokumentu so predstavljene metode, postopki in najpomembnejši rezultati preverjanja sortne pristnosti pomembnejših vrst žit in križnic z vidika preverjanja kakovosti semena ter na genetskem nivoju z uporabo DNA markerjev. Skupno smo v projektu analizirali 53 sort, kar je pomenilo analizo 403 genotipov žit in križnic. V genetski analizi smo uporabili 46 različnih DNA markerjev, ki vključujejo 3 različne markerske sisteme: 43 tipa SSR (angl. Short Sequence Repeat), 2 tipa SCAR (angl. Sequence Characterized Amplified Region) in enega tipa CAPS (angl. Cleaved Amplified Polymorphic Sequences).

2 SPLOŠNI MATERIALI IN POSTOPKI, UPORABLJENI PRI ANALIZAH VSEH VRST ŽIT IN KRIŽNIC

V tem poglavju bomo predstavili in opisali vse materiale in metode, ki so glede na način izvedbe analiz skupne za vseh pet sklopov rastlinskih vrst žit in križnic (pšenica/pira/rž, ječmen, oves, ajda in križnice). Specifike analiz vsakega sklopa bodo predstavljene v ločenih poglavjih in se bodo navezovala na opise v tem poglavju (točka 2). Literatura, uporabljena in/ali citirana v celotnem dokumentu, je na voljo pri avtorjih publikacije. Fotografij rezultatov analize kakovosti semena/klic v točkah 3.2, 4.2, 5.2, 6.2 in 7.2 nismo številčili, saj smo opise navajali neposredno ob fotografijah in bi dodatno poimenovanje fotografij lahko zmedlo bralca.

2.1 Priprava seznama sort žit in križnic

Izbor sort/vrst/rodov smo pripravili na podlagi pregleda strokovne literature, dostopnih baz podatkov, nacionalnih ter internih publikacij. Osredotočili smo se na izbor agronomsko pomembne vrste žit in križnic, ki so vpisane na slovenski ali evropski sortni listi ter se njihov material prideluje ali uradno potrjuje v Sloveniji.

Preglednice po sklopih predstavljajo seznam sort, ki smo jih vključili v projekt V4-1806 po pregledu veljavne slovenske sortne liste in semenske pridelave preko uradnih standardnih vzorcev.

V projekt so bile dodatno, in sicer z genetsko analizo, vključene tudi vrste, ki jih je na nivoju fenotipa in morfoloških karakteristik semena, klic ali rastlin v semenski pridelavi težko prepoznavati in razločevati. To so vrste *Brassica rapa*, *Sinapis arvensis* in *Avena nuda*, ki jih na spodnjih seznamih ni. Vključena je tudi sorta navadne pšenice Nexera, ki je bila dodatno na sortni listi v letu 2020, ko je projekt že intenzivno tekel in smo jo še lahko smiselno vključili.

2.2 Priprava ter analiza kakovosti semena vključenih sort

V analizah, ki so bile izvedene v International Seed Testing Association (ISTA) akreditiranem Semenskem laboratoriju Kmetijskega inštituta Slovenije (KIS), smo za vsako sorto opravili analizo kakovosti semena (tj. določili čistoto in kalivost) po veljavnih ISTA protokolih. Na podlagi morfologije semena smo oblikovali podskupine, če so se semena iste sorte med seboj morfološko razlikovala. Semena in mlade rastline vsake sorte smo tudi fotografirali.

Seme vzorcev agronomsko pomembnih vrst oz. sort žit in križnic, ki smo jih vključili v projekt, smo pridobili iz arhiva zbirke standardnih vzorcev semena, katerega skrbnik je KIS. V zbirki so shranjeni standardni vzorci semenskega materiala zavarovanih sort in sort vpisanih v sortno listo v skladu z Zakonom o semenskem materialu kmetijskih rastlin in Zakonom o varstvu novih sort rastlin.

Iz vsakega uradnega standardnega vzorca semena smo naključno našli 100 semen, pri čemer smo dosledno upoštevali definicijo čistega semena, ki jo določajo pravila mednarodne zveze za testiranje semena ISTA. Vežano na definicijo smo med čisto seme šteli vsako seme, ki pripada deklarirani oz. v laboratoriju identificirani rastlinski vrsti, in sicer:

- zrelo in nepoškodovano seme osnovne velikosti,
- nedozorelo, gluho ali vzkliko seme nad polovico osnovne velikosti,
- deli semena večji od polovice osnovne velikosti,
- seme ajde, ki nima semenske ovojnice,
- golci žit nad polovico osnovne velikosti.

Celoten vzorec 100 semen smo natančno pogledali, vsako seme posebej, s prostim očesom, s pomočjo digitalne lupe ali celo s pomočjo binokularnega mikroskopa. V nadaljevanju smo seme glede na enotnost oblike, barve in strukture povrhnjice razvrstili v eno ali več skupin. Nekateri vzorci so bili zelo uniformni in je bilo seme razvrščeno v eno samo skupino, drugi pa precej raznoliki in je bilo seme razvrščeno v več skupin, a največ v tri skupine.

Vsak delovni postopek smo dokumentirali z opisi posameznih skupin semena in s fotografijami. Fotografirali smo vsak vzorec naključno naštetih 100 semen posamezne sorte in vzorčke semena posameznih podskupin, če je bilo seme zaradi raznolikosti dodatno razvrščeno.

V nadaljevanju smo za potrebe pridobitve mladih rastlin izvajali kalilne poskuse za vsako skupino semen. Iz posamezne skupine smo za postopek kalitve našeli največ 50 semen; v primeru, da je bilo v posamezni skupini manj kot 50 semen, pa smo v postopek kalitve vključili vse.

Poskusi so potekali pri pogojih, ki jih za posamezno rastlinsko vrsto določajo pravila ISTA:

- za substrat smo uporabili suh kremenčev pesek (velikost delcev: 0,05 do 0,8 mm; pH 6,0 do 7,5; dobavitelj: EKW Kremen, Novo mesto) in vodo iz pipe (pH 6,0 do 7,5);
- v majhne plastične posode smo naložili 2 cm substrata, nanj smo razporedili seme in ga prekrili s tanjšo plastjo enakega substrata;
- seme je kalilo pri naslednjih pogojih:
 - seme križnic in žit, razen navadne in tatarske ajde, je kalilo najprej 4 dni v temi pri nizki temperaturi +7 °C, potem pa 8 dni pri višji konstantni temperaturi +20 °C in fotoperiodi z 8 urami teme in 16 urami svetlobe;
 - seme navadne in tatarske ajde je 6 dni kalilo le pri visoki izmenični temperaturi in fotoperiodi z 8 urami svetlobe pri temperaturi 30 °C in 16 urami teme pri temperaturi 20 °C.

Vsaki analizni številki smo pripisali štiri oz. osem individualnih rastlin/genotipov, vsako s svojo laboratorijsko oznako genotipa (preglednice s seznamom vključenih sort pri vsakem sklopu rastlin). Po štiri rastline za vsako sorto smo analizirali pri samoprašnih vrstah, po osem genotipov na sorto pa za tujeprašne rastlinske vrste z namenom ovrednotit molekulske variabilnost znotraj sorte (rezultati AMOVA in analize glavnih koordinat - PCoA pri vsakem sklopu rastlin). Če smo pri analizah na nivoju fenotipa semena in/ali klic opazili razlike znotraj posamezne sorte, smo le-to razdelili na podvzorke in jih nadalje analizirali ločeno.

2.3 Genetska analiza

2.3.1 Izolacija DNA ter preverjanje kakovosti in količine DNA

Izolacija DNA je potekala različno glede na analizirano rastlinsko vrsto in bo predstavljena pri vsakem sklopu rastlin posebej. Skupno vsem sklopom rastlin pa je preverjanje kakovosti in količine izolirane DNA.

Prisotnost in kvaliteto genske DNA smo zaznali s horizontalno gelsko elektroforezo. DNA je negativno nabita in potuje po agaroznem gelu, ki je pod napetostjo. Agarozni gel, ki smo ga pripravili iz agaroze in pufru TBE (borova kislina 44,5 mmol/l; Trizma Base 44,6 mmol/l; EDTA 10 mmol/l), tvori mrežo, po kateri manjši fragmenti DNA potujejo hitreje kot večji fragmenti, kar nam je služilo za zaznavanje morebitne razkrojenosti DNA, v nadaljnjih fazah poskusa pa tudi za ločevanje različno velikih produktov PCR. Ker smo pred potekom elektroforeze dodali fluorescenčno barvilo, ki se veže na DNA (tj. etidijev bromid - v nadaljevanju EtBr), smo lahko DNA vizualizirali pod UV svetlobo.

Izolirano DNA smo preverili na 1 % agaroznem gelu. V posamezen žepek agaroznega gela smo nanесли 5 µl izolirane DNA, ki smo jo predhodno zmešali s 5 µl pufru za potovanje nukleinskih kislin (pripravljen iz 6X

TriTrack DNA loading dye, Thermo fisher, v nadaljevanju LB). Kot lestvico nukleinskih kislin smo uporabili GeneRuler velikosti 1 kb (Thermoscientific™ DNA Ruller™ 1 kb DNA Ladder). Ločevanje je potekalo na sistemu za horizontalno elektroforezo (Gibco BRL, Life Technologies). Potovanje celokupne genomske DNA je potekalo pri električni napetosti 100 V, 50 minut. Vizualizacijo gela smo opravili s sistemom GeneGenius, Syngene in programsko opremo GeneSnap, Syngene. Koncentracijo DNA smo izmerili na fluorometru (Qubit™ 3.0; ThermoFisher Scientific, MA, USA), s kitom Qubit™ dsDNA Broad Range Assay (Thermo Scientific). DNA smo pufrom TE redčili do delovne koncentracije 10 ng/μl in jo ponovno preverili na 1 % agaroznem gelu.

2.3.2 Priprava in izvedba verižne reakcije s polimerazo (PCR)

Za reakcije namnoževanja markerjev smo uporabili dva različna seta/tipa kemikalij. Primarno so to bile kemikalije Biotools (v nadaljevanju: BT). Za bolj zahtevne vzorce nam je kot robustna alternativa služila zmes kemikalij QuantaBio AccuStart™ II PCR ThoughMix R (v nadaljevanju: QB), ki smo ji dodali le začetne oligonukleotide in unierzalne fluorescenčne oligonukleotide. Reakcijo smo pripravili po že objavljenih protokolih (Pipan in sod., 2013; Meglič in Pipan 2018; Pipan in Meglič, 2019).

V prvem koraku smo vsak marker optimizirali glede na ustrezno reakcijsko mešanico in temperaturni profil v PCR. Za optimizacijo smo izbrali 7 naključnih vzorcev, na katerih smo izvedli PCR pri različnih pogojih. Ko smo uporabili ustrezen protokol, pri katerem se je tarčno zaporedje uspešno pomnožilo, smo izvedli PCR vseh vzorcev. Uporabili smo PCR protokole, ki so opisani kot:

- PCR protokol Piquemal - protokol 1: optimiziran po Pipan in sod., 2013; Pipan in sod., 2016; Pipan in sod., 2017, Pipan in Meglič, 2019;
- PCR protokol Modified Piquemal – protokol 2: optimiziran po Pipan in sod., 2013; Pipan in sod., 2016; Pipan in sod., 2017, Pipan in Meglič, 2019;
- PCR protokol Qlocus-askura - protokol 3: optimiziran po Asakura in sod., 2009;
- PCR protokol SSR-tail – protokol 4: optimiziran po Pipan in Meglič, 2019;
- PCR protokol scar7_johns_bt – protokol 5: optimiziran po Iñiguez-Luy in sod., 2006;
- PCR protokol scar1_johns_bt – protokol 6: optimiziran po Iñiguez-Luy in sod., 2006.

Reakcije smo izvedli v cikličnih termostatih Veriti 96-Well Thermal Cyler (Applied Biosystems) ali SureCycler 8800 (Agilent Technologies) ter zagnali ustrezen PCR protokol glede na temperaturne zahteve za posamezen marker. V analizi smo uporabili trinajst markerjev, ki določajo nivo razlikovanja znotraj ali med vrstami rži, pira in pšenice.

2.3.3 Kvalitativna obravnava PCR produktov

Po končanem PCR smo produkte preverili na horizontalni gelski elektroforezi na 1,4 % (oziroma 2 % v primeru markerja CAPS) agaroznem gelu in ga fotografirali z UV svetlobo (GeneGenius in GeneSnap, Syngene). Pri vsakem vzorcu smo za posamezen marker lahko razbrali prisotnost pomnoženega fragmenta, za orientacijo nam je služil podatek o pričakovani velikosti fragmenta, ki smo ga dobili v literaturi, in lestvica nukleinskih kislin. Ta tip analize je bil končen pri CAPS markerju (skupina pšenica/pira/rž) ter pri SCAR markerjih (skupina križnic).

2.3.4 Fragmentna analiza in prikaz rezultatov

Pri SSR (Simple Sequence Repeats) markerjih smo za najbolj natančno razlikovanje in določanje polimorfizmov opravili primerjavo alelnih profilov (fragmentna analiza) na sekvenatorju 3130XL Genetic

Analyzer (Applied Biosystems; ABI 3130). Elektroferograme smo prebrali v programu GeneMapper 6.0 ter na podlagi kodominantnih vhodnih matrik izvedli analizo podatkov z uporabo programov in programskih paketov s področja populacijske genetike (GenAleX, Arlequin, Populations, Genetix, MsToolkit, Structure). Prikazali smo najbolj pomembne rezultate, in sicer:

- frekvence alelov posameznega markerja pri posamezni vrsti/sorti/podvzorcu sorte;
- ustreznost/sposobnost posameznega markerja za razločevanje med vrstami/sortami/podvzorci in znotraj njih glede na odstopanje od Hardy-Weinbergovega ravnotežja (HWE);
- izračunali smo genetsko podobnost med vrstami/sortami/podvzorci glede na Nei-jevo standardno genetsko razdaljo (Nei, 1972);
- izračunali delež molekulske variabilnosti (AMOVA) med vrstami/sortami/podvzorci sort, znotraj vključenih genotipov in med njimi;
- prikazali delež pojasnjene molekulske variabilnosti v analizi glavnih koordinat (PCoA).

3 PŠENICA, PIRA IN RŽ

V analizi smo uporabili 16 sort pšenice (Preglednica 1). Pri sortah Anđelika, Gorolka, Marinka, Savinja in Zvezdana smo imeli po dva različna fenotipa semen, vsakemu izmed njiju je pripadala svoja analizna številka. Vsaki analizni številki smo pripisali štiri individualne rastline/genotipe, vsako s svojo laboratorijsko oznako genotipa. Po štiri rastline za vsako sorto smo analizirali pri samoprašnih vrstah, po osem genotipov na sorto pa za tujeprašne rastlinske vrste. V tem sklopu analiz je bila izjema sorta Zvezdana, kjer smo pri enem fenotipu imeli na voljo le tri rastline. Za sorte Ficko, NS Metka, Primorka, Reska, Simonida, Vulkan, smo imeli le eno analizno številko, za vsako smo uporabili štiri individualne rastline. Za sorte Xt 88.86 (Xt 86) ŽS, Nexera 86, Nexera 923, Xt 88.86, Xt 9.23 in Xt 9.28 smo za genotipizacijo uporabili izolirano DNA iz prejšnjih internih analiz. Pri teh smo uporabili izolirano DNA štirih individualnih rastlin, razen pri Xt 88.86 (Xt 86) ŽS, kjer smo uporabili izolirano DNA osmih individualnih rastlin, kot pri vseh tujeprašnih rastlinah. Ker smo uporabljali predhodno izolirano DNA, nimamo podatka o analizni številki in o fenotipu rastlin (NP = ni podatka).

Uporabili smo dve sorti pire, Mursko belo in Mursko dolgoklaso. Pri obeh smo imeli opravka s semeni brez plev in s semeni v plevah. Za vsako različico semena – analizno številko – smo vzeli štiri individualne rastline.

Rž je predstavljala ena sorta, Belokranjska rž, ki je združevala tri različne fenotipe semen. Za vsak fenotip smo vzeli osem individualnih rastlin.

3.1 Specifični/e materiali in metode v analizi

Preglednica 1: Seznam sort, analizne številke, število individualnih rastlin v analizi in laboratorijske oznake genotipov pri analizi navadne pšenice, pire in rži (NP = ni podatka)

- Pšenica

Sorta	Analizna številka	Število individualnih rastlin v analizi	Laboratorijska oznaka genotipa
Anđelika	1208-1/19 in 1208-2/19	4 + 4	34-1a...34-1d in 34-2a...34-2d
Gorolka	1210-1/19 in 1210-2/19	4 + 4	36-1a...36-1d in 36-2a...36-2d
Marinka	1211-1/19 in 1211-2/19	4 + 4	37-1a...37-1d in 37-2a...37-2d
Savinja	1215-1/19 in 1215-2/19	4 + 4	41-1a...41-1d in 41-2a...41-2d
Zvezdana	1218-1/19 in 1218-2/19	4 + 3	44a...44d in 44-2a...44-2c
Xt 88.86 (Xt 86) ŽS	NP	4	48a...48d
Ficko	1209-1/19	4	35a...35d
NS Metka	1212-1/19	4	38a...38d
Primorka	1213-1/19	4	39a...39d
Reska	1214-1/19	4	40a...40d
Simonida	1216-1/19	4	42a...42d

Sorta	Analizna številka	Število individualnih rastlin v analizi	Laboratorijska oznaka genotipa
Vulkan	1217-1/19	4	43a...43d
Xt 88.86 (Xt 86) ŽS	NP	4	49a...49d
Nexera 86	NP	4	50a...50d
Nexera 923	NP	4	51a...51d
Xt 9.23	NP	4	53a...53d
Xt 9.28	NP	4	54a...54d
Xt 88.86	NP	4	52a...52d

- Pira

Sorta	Analizna številka	Število individualnih rastlin v analizi	Laboratorijska oznaka genotipa
Murska bela (semena brez plev)	1219a-1/19	4	45-1a...45-1d
Murska bela (semena v plevah)	1219b-1/19	4	45-2b...45-2d
Murska dolgoklasa (semena brez plev)	1220a-1/19	4	46-1a...46-1d
Murska dolgoklasa (semena v plevah)	1220b-1/19	4	46-2a...46-2d

- Rž

Sorta	Analizna številka	Število individualnih rastlin v analizi	Laboratorijska oznaka genotipa
Belokranjska rž	1206-1/19	8	32-1a...32-1h
Belokranjska rž	1206-2/19	8	32-2a...32-2h
Belokranjska rž	1206-3/19	8	32-3a...32-3h

Izolacijo genomske DNA posameznih vzorcev smo opravili na robotu za izolacijo nukleinskih kislin MagMax™ (Applied Biosystems). Uporabili smo kemikalije iz kompleta za izolacijo DNA BioSprint 15 DNA Plant (Qiagen). Izolacijo DNA smo izvedli po optimiziranem protokolu (opisan v Pipan in Meglič 2019).



Slika 1: Priprava rastlinskega tkiva za izolacijo DNA

Preglednica 2: Seznam markerjev in njihove aplikacije pri rži, piri in navadni pšenici

Ime markerja (oznaka v laboratoriju)	Tip markerja	Nivo razlikovanja	PCR protokol	Uporabljena kemija v PCR	Dolžinski standard v fragmentni analizi
<i>Xgwm261-2D (a)</i>	SSR	Raznolikost pšenice	Piquemal	BT	ROX 500
<i>Xgwm408-5B (b)</i>	SSR	Ločevanje znotraj visoko sorodnimi sortami pšenice in tritikale	Modified Piquemal	QB	ROX 500
<i>Xgwm577-7B (c)</i>	SSR	Raznolikost in razločevanje med pšenica/rž/tritikala	Modified Piquemal	BT	ROX 500
<i>SCM138 (d)</i>	SSR	Raznolikost rži	Modified Piquemal	QB	ROX 500
<i>SCM268 (e)</i>	SSR	Raznolikost rži	Modified Piquemal	QB	ROX 500
<i>SCM9 (f)</i>	SSR	Raznolikost in razločevanje med pšenica/rž/tritikala	Modified Piquemal	QB	ROX 500
<i>SCM120 (g)</i>	SSR	Raznolikost in razločevanje med pšenica/rž/tritikala	Piquemal	BT	ROX 500
<i>SCM28 (h)</i>	SSR	Raznolikost in razločevanje med ržjo in tritikalo	Piquemal	QB	ROX 500
<i>SCM86 (i)</i>	SSR	Raznolikost in razločevanje med ržjo in tritikalo	Modified Piquemal	QB	ROX 500
<i>BARC176 (j)</i>	SSR	Specifičen za pšenico in trikalno	Piquemal	QB	ROX 500
<i>VMS159 (l)</i>	SSR	Razločevanje med pšenico in piro	Piquemal	QB	ROX 500
<i>VMS182 (m)</i>	SSR	Razločevanje med pšenico in piro	Modified Piquemal	QB	ROX 500
<i>LI in RI (k)</i>	CAPS	Razločevanje med pšenico in piro	Qlocus Askura	BT	NA

Analiza CAPS (angl. cleaved amplified polymorphic sequences) markerjev je potekala v treh korakih:

1. PCR s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi,
2. restrikcija PCR produktov z endonukleazo (restrikcijski encim) in
3. ločevanje produktov restrikcije na gelu.

Pomnožene fragmente smo po preverjanju na 1,4 % agaroznem gelu v drugem koraku razrezali z restrikcijskim encimom FastDigest MspI (Thermo Scientific). Po končanem PCR smo produkte preverili na horizontalni gelski elektroforezi na 2 % gelu v primeru markerja CAPS agaroznem gelu in gel fotografirali (GeneGenius in GeneSnap, Syngene). Pri vsakem vzorcu smo lahko razbrali prisotnost pomnoženega fragmenta, za orientacijo nam je služil podatek o pričakovani velikosti fragmenta, ki smo ga dobili v literaturi in lestvica nukleinskih kislin.

3.2 Rezultati analize kakovosti semena

Za vsako analizno številko navadne pšenice, pire in rži smo zabeležili število semen, ki smo jih dali na test kalivosti, število normalnih, nenormalnih klic, mrtvih semen in delež normalnih, nenormalnih klic ter mrtvih semen (Preglednica 3-5), klice pa smo tudi fotografirali.

- **Pšenica**

Preglednica 3: Podatki o številu semen, ki smo jih dali na test kalivosti, številu normalnih in nenormalnih klic, mrtvih semen ter delež normalnih in nenormalnih klic in mrtvih semen za sorte navadne pšenice

Sorta	Analizna številka	Število individualnih rastlin v analizi	Laboratorijska oznaka genotipa
Andelika	1208-1/19 in 1208-2/19	4 + 4	34-1a...34-1d in 34-2a...34-2d
Gorolka	1210-1/19 in 1210-2/19	4 + 4	36-1a...36-1d in 36-2a...36-2d
Marinka	1211-1/19 in 1211-2/19	4 + 4	37-1a...37-1d in 37-2a...37-2d
Savinja	1215-1/19 in 1215-2/19	4 + 4	41-1a...41-1d in 41-2a...41-2d
Zvezdana	1218-1/19 in 1218-2/19	4 + 3	44a...44d in 44-2a...44-2c
Xt 88.86 (Xt 86) ŽS	NP	4	48a...48d
Ficko	1209-1/19	4	35a...35d
NS Metka	1212-1/19	4	38a...38d
Primorka	1213-1/19	4	39a...39d
Reska	1214-1/19	4	40a...40d
Simonida	1216-1/19	4	42a...42d
Vulkan	1217-1/19	4	43a...43d
Xt 88.86 (Xt 86) ŽS	NP	4	49a...49d
Nexera 86	NP	4	50a...50d
Nexera 923	NP	4	51a...51d
Xt 9.23	NP	4	53a...53d
Xt 9.28	NP	4	54a...54d
Xt 88.86	NP	4	52a...52d

- 1.) Sorta Anđelika: kalivost semen z analiznima številčkama 1208-1/19 (1) in 1208-2/19 (2) je bila 97 % in 98 % (razvoj normalnih klic).



- 2.) Ficko: kalivost semen z analizno številčko 1209-1/19 je bila 88 %.



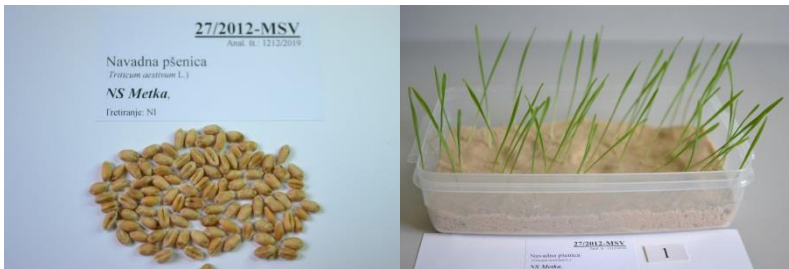
- 3.) Gorolka: kalivost semen z analiznima številčkama 1210-1/19 (1) in 1210-2/19 (2) je bila 74 % in 66 %.



- 4.) Marinka: kalivost semen z analiznima številčkama 1211-1/19 (1) in 1211-2/19 (2) je bila 98 % in 100 %.



5.) NS Metka: kalivost semen z analizo številko 1212-1/19 je bila 100 %.



6.) Primorka: kalivost semen z analizo številko 1213-1/19 je bila 96 %.



7.) Reska: kalivost semen z analizo številko 1214-1/19 je bila 98 %.



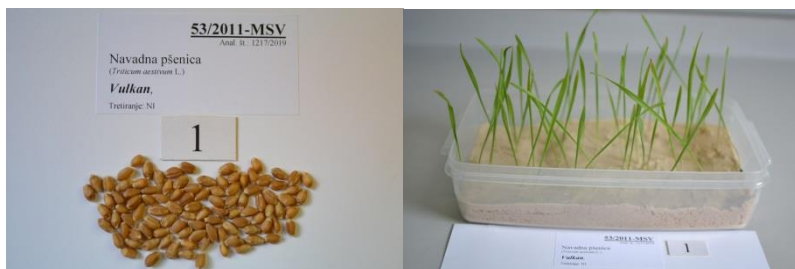
8.) Savinja: kalivost semen z analiznima številkama 1215-1/19 (1) in 1215-2/19 (2) je bila 52 % in 24 %.



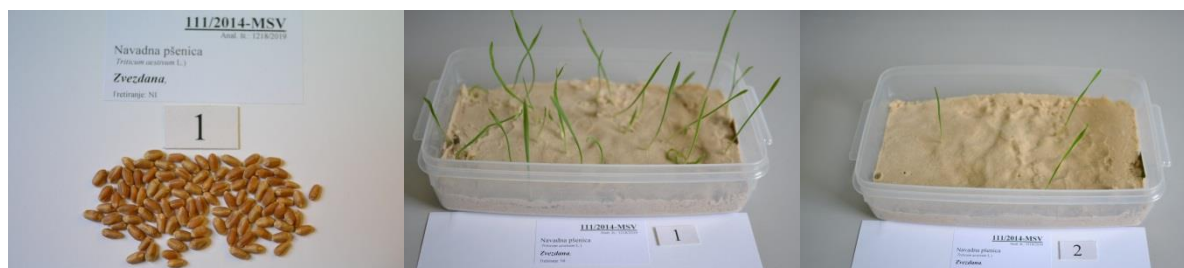
9.) Simonida: kalivost semen z analizo številko 1216-1/19 je bila 40 %.



10.) Vulkan: kalivost semen z analizo številko 1217-1/19 je bila 96 %.



11.) Zvezdana: kalivost semen z analiznima številka 1218-1/19 (1) in 1218-2/19 (2) je bila 42 % in 100 %.



- Pira

Preglednica 4: Podatki o številu semen, ki smo jih dali na test kalivosti, številu normalnih, nenormalnih klic, mrtvih semen in delež normalnih, nenormalnih klic in mrtvih semen za sorte pire

Sorta	Analizna številka	ŠT.SEME N na test kalivosti	REZULTATI - število klic/semen			REZULTATI - delež klic/semen (%)		
			NORMA LNE klice	NENOR MALNE klice	MRTVA A semena	NORMA LNE klice	NENORMAL NE klice	MRTVA semena
Murska Bela (seme brez plev)	1219a-1/19	50	48	0	2	96	0	4
Murska Bela (seme v plevah)	1219b-1/19	50	45	0	5	90	0	10
Murska dolgoklasa (seme brez plev)	1220a-1/19	50	45	0	5	90	0	10
Murska dolgoklasa (seme v plevah)	1220b-1/19	50	43	0	7	86	0	14

Pri obeh sortah smo imeli opravka z dvema različicama semen (ena so bila v plevah, druga brez plev).

- 1.) Murska Bela: kalivost semen z analiznima številka 1219a-1/19 - brez plev (a) in 1219b-1/19 - v plevah (b), je bila 96 % (1a) in 90 % (1b) (razvoj normalnih klic).



- 2.) Murska Bela: kalivost semen z analiznima številka 1220a-1/19 – brez plev (a) in 1220b-1/19 – v plevah (b), je bila 90 % (2a) in 86 % (2b).



• RŽ

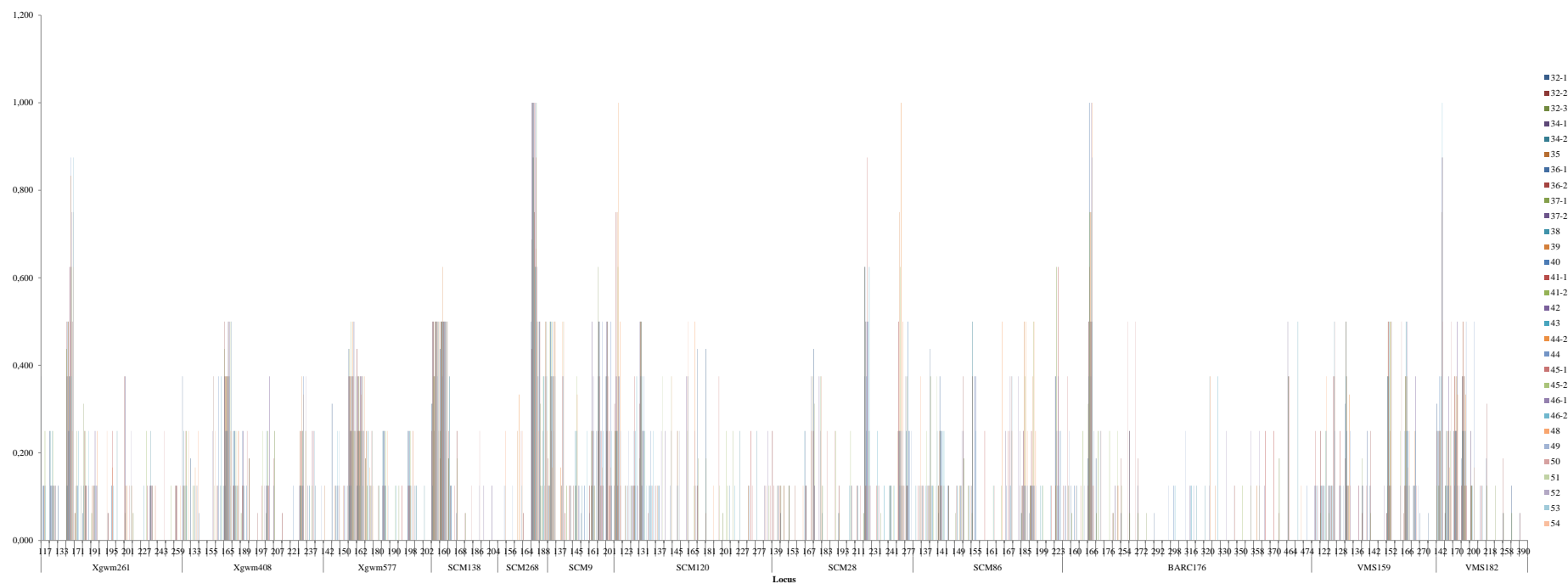
Preglednica 5: Podatki o številu semen, ki smo jih dali na test kalivosti, številu normalnih in nenormalnih klic, mrtvih semen ter delež normalnih in nenormalnih klic in mrtvih semen za sorte rži

Sorta	Analizna številka	ŠT.SEME N na test kalivosti	REZULTATI - število klic/semen			REZULTATI - delež klic/semen (%)		
			NORMALN E klice	NENORMALN E klice	MRTV A semena	NORMALN E klice	NENORMALN E klice	MRTV A semena
Belokranjska rž	1206-1/19	50	49	0	1	98	0	2
Belokranjska rž	1206-2/19	19	18	0	1	95	0	5
Belokranjska rž	1206-3/19	12	10	1	1	84	8	8

Pri sorti Belokranjska rž je bila kalivost semen z analiznimi številkami 1206-1/19 (1), 1206-2/19 (2) in 1206-3/19 (3), 98 %, 95 % in 84 % (razvoj normalnih klic).



3.3 Rezultati genetske analize



Slika 2: Frekvenca posameznih alelov po lokusih glede na vrsto/sorto/podvzorec pšenice, rži in pira

Rezultati analize s CAPS markerjem L1 in R1 je podal uniformne pomnožke pšenice, 323 bp, vendar so bile prisotne posamezne razlike med naključnimi genotipi znotraj sort, kjer se marker ni pomnožil. Pri rži se ni pomnožil, pri piri pa je vseboval dva fragmenta velikosti 137 bp in 186 bp.

Preglednica 6: Ustreznost posameznega markerja za razločevanje med pšenico, ržjo in piro ter zmožnost ločevanja znotraj njih glede na rezultate Hardy-Weinbergovega ravnotežja

Vrsta/sorta/podvzorec	Lokus/marker	Vsota kvadratov	Verjetnost	Statistična značilnost
32-1	Xgwm261	27,556	0,025	*
32-1	Xgwm408	32,889	0,005	**
32-1	Xgwm577	16,000	0,014	*
32-1	SCM138	11,810	0,066	ns
32-1	SCM268	8,000	0,005	**
32-1	SCM9	24,000	0,008	**
32-1	SCM120	16,000	0,001	**
32-1	SCM28	14,857	0,462	ns
32-1	SCM86	24,000	0,065	ns
32-1	BARC176	30,000	0,092	ns
32-1	VMS159	40,000	0,066	ns
32-1	VMS182	25,209	0,238	ns
32-2	Xgwm261	8,000	0,238	ns
32-2	Xgwm408	8,000	0,629	ns
32-2	Xgwm577	10,032	0,018	*
32-2	SCM138	18,000	0,055	ns
32-2	SCM268	8,000	0,046	*
32-2	SCM9	29,333	0,015	*
32-2	SCM120	16,960	0,321	ns
32-2	SCM28	32,000	0,006	**
32-2	SCM86	24,000	0,065	ns
32-2	BARC176	25,778	0,215	ns
32-2	VMS159	30,667	0,079	ns
32-2	VMS182	24,320	0,060	ns
32-3	Xgwm261	24,000	0,065	ns
32-3	Xgwm408	24,000	0,008	**
32-3	Xgwm577	16,000	0,014	*
32-3	SCM138	18,311	0,050	*
32-3	SCM268	1,653	0,199	ns
32-3	SCM9	2,880	0,090	ns
32-3	SCM120	32,000	0,006	**
32-3	SCM28	40,000	0,066	ns
32-3	SCM86	27,111	0,167	ns
32-3	BARC176	40,000	0,297	ns
32-3	VMS159	20,500	0,154	ns
32-3	VMS182	27,556	0,153	ns
34-1	Xgwm261	12,000	0,062	ns
34-1	Xgwm408	12,000	0,679	ns
34-1	Xgwm577	12,000	0,062	ns
34-1	SCM138	4,000	0,046	*
34-1	SCM268	NA	NA	
34-1	SCM9	4,000	0,046	*
34-1	SCM120	4,000	0,677	ns
34-1	SCM28	12,000	0,062	ns

Vrsta/sorta/podvzorec	Lokus/marker	Vsota kvadratov	Verjetnost	Statistična značilnost
34-1	SCM86	8,000	0,046	*
34-1	BARC176	4,000	0,046	*
34-1	VMS159	4,000	0,261	ns
34-1	VMS182	6,667	0,353	ns
34-2	Xgwm261	16,000	0,100	ns
34-2	Xgwm408	16,000	0,100	ns
34-2	Xgwm577	20,000	0,172	ns
34-2	SCM138	4,000	0,261	ns
34-2	SCM268	0,082	0,775	ns
34-2	SCM9	9,000	0,174	ns
34-2	SCM120	4,000	0,261	ns
34-2	SCM28	1,440	0,696	ns
34-2	SCM86	4,000	0,261	ns
34-2	BARC176	12,000	0,062	ns
34-2	VMS159	12,000	0,062	ns
34-2	VMS182	10,000	0,440	ns
35	Xgwm261	12,000	0,679	ns
35	Xgwm408	12,000	0,285	ns
35	Xgwm577	6,667	0,353	ns
35	SCM138	4,000	0,046	*
35	SCM268	NA	NA	
35	SCM9	4,000	0,046	*
35	SCM120	5,000	0,544	ns
35	SCM28	4,160	0,245	ns
35	SCM86	12,000	0,285	ns
35	BARC176	4,000	0,261	ns
35	VMS159	4,000	0,261	ns
35	VMS182	4,000	0,261	ns
36-1	Xgwm261	16,000	0,100	ns
36-1	Xgwm408	12,000	0,285	ns
36-1	Xgwm577	12,000	0,062	ns
36-1	SCM138	4,000	0,046	*
36-1	SCM268	NA	NA	
36-1	SCM9	4,000	0,046	*
36-1	SCM120	4,000	0,677	ns
36-1	SCM28	4,160	0,245	ns
36-1	SCM86	12,000	0,679	ns
36-1	BARC176	NA	NA	
36-1	VMS159	6,667	0,353	ns
36-1	VMS182	8,000	0,629	ns
36-2	Xgwm261	9,000	0,174	ns
36-2	Xgwm408	12,000	0,285	ns
36-2	Xgwm577	12,000	0,062	ns
36-2	SCM138	4,000	0,046	*
36-2	SCM268	NA	NA	
36-2	SCM9	12,000	0,062	ns
36-2	SCM120	8,000	0,046	*
36-2	SCM28	16,000	0,100	ns

Vrsta/sorta/podvzorec	Lokus/marker	Vsota kvadratov	Verjetnost	Statistična značilnost
36-2	SCM86	20,000	0,172	ns
36-2	BARC176	1,440	0,230	ns
36-2	VMS159	4,000	0,261	ns
36-2	VMS182	4,000	0,261	ns
37-1	Xgwm261	4,000	0,261	ns
37-1	Xgwm408	12,000	0,285	ns
37-1	Xgwm577	4,000	0,261	ns
37-1	SCM138	4,000	0,261	ns
37-1	SCM268	0,082	0,775	ns
37-1	SCM9	4,000	0,677	ns
37-1	SCM120	1,000	0,801	ns
37-1	SCM28	4,000	0,261	ns
37-1	SCM86	3,360	0,339	ns
37-1	BARC176	0,444	0,505	ns
37-1	VMS159	4,889	0,558	ns
37-1	VMS182	8,000	0,629	ns
37-2	Xgwm261	20,000	0,521	ns
37-2	Xgwm408	12,000	0,285	ns
37-2	Xgwm577	12,000	0,062	ns
37-2	SCM138	12,000	0,285	ns
37-2	SCM268	NA	NA	
37-2	SCM9	4,000	0,046	*
37-2	SCM120	1,444	0,695	ns
37-2	SCM28	5,000	0,544	ns
37-2	SCM86	8,000	0,629	ns
37-2	BARC176	16,000	0,100	ns
37-2	VMS159	28,000	0,464	ns
37-2	VMS182	8,000	0,238	ns
38	Xgwm261	12,000	0,679	ns
38	Xgwm408	12,000	0,679	ns
38	Xgwm577	12,000	0,285	ns
38	SCM138	4,000	0,261	ns
38	SCM268	NA	NA	
38	SCM9	4,000	0,261	ns
38	SCM120	12,444	0,256	ns
38	SCM28	16,000	0,382	ns
38	SCM86	20,000	0,521	ns
38	BARC176	4,000	0,046	*
38	VMS159	4,000	0,046	*
38	VMS182	12,000	0,285	ns
39	Xgwm261	12,000	0,679	ns
39	Xgwm408	12,000	0,062	ns
39	Xgwm577	20,000	0,172	ns
39	SCM138	1,440	0,230	ns
39	SCM268	4,000	0,046	*
39	SCM9	12,000	0,285	ns
39	SCM120	0,444	0,931	ns
39	SCM28	8,000	0,046	*

Vrsta/sorta/podvzorec	Lokus/marker	Vsota kvadratov	Verjetnost	Statistična značilnost
39	SCM86	4,000	0,261	ns
39	BARC176	8,000	0,046	*
39	VMS159	12,000	0,285	ns
39	VMS182	8,000	0,046	*
40	Xgwm261	12,000	0,679	ns
40	Xgwm408	11,111	0,349	ns
40	Xgwm577	12,000	0,062	ns
40	SCM138	4,000	0,261	ns
40	SCM268	0,444	0,505	ns
40	SCM9	8,000	0,629	ns
40	SCM120	8,000	0,629	ns
40	SCM28	4,000	0,261	ns
40	SCM86	12,000	0,285	ns
40	BARC176	16,444	0,353	ns
40	VMS159	20,000	0,521	ns
40	VMS182	5,111	0,530	ns
41-1	Xgwm261	8,160	0,227	ns
41-1	Xgwm408	8,000	0,238	ns
41-1	Xgwm577	12,000	0,062	ns
41-1	SCM138	4,000	0,046	*
41-1	SCM268	NA	NA	
41-1	SCM9	12,000	0,062	ns
41-1	SCM120	3,333	0,766	ns
41-1	SCM28	0,082	0,775	ns
41-1	SCM86	1,440	0,696	ns
41-1	BARC176	8,000	0,046	*
41-1	VMS159	12,000	0,285	ns
41-1	VMS182	12,000	0,285	ns
41-2	Xgwm261	8,444	0,207	ns
41-2	Xgwm408	12,000	0,062	ns
41-2	Xgwm577	12,000	0,062	ns
41-2	SCM138	4,000	0,046	*
41-2	SCM268	1,440	0,230	ns
41-2	SCM9	4,000	0,261	ns
41-2	SCM120	4,160	0,245	ns
41-2	SCM28	4,160	0,245	ns
41-2	SCM86	2,333	0,506	ns
41-2	BARC176	0,444	0,505	ns
41-2	VMS159	4,000	0,261	ns
41-2	VMS182	3,333	0,766	ns
42	Xgwm261	1,440	0,696	ns
42	Xgwm408	4,000	0,261	ns
42	Xgwm577	12,000	0,062	ns
42	SCM138	4,000	0,046	*
42	SCM268	NA	NA	
42	SCM9	12,000	0,062	ns
42	SCM120	8,444	0,207	ns
42	SCM28	5,000	0,172	ns

Vrsta/sorta/podvzorec	Lokus/marker	Vsota kvadratov	Verjetnost	Statistična značilnost
42	BARC176	NA	NA	
42	VMS159	4,000	0,261	ns
42	VMS182	4,000	0,261	ns
43	Xgwm261	12,000	0,285	ns
43	Xgwm408	12,000	0,285	ns
43	Xgwm577	12,000	0,285	ns
43	SCM138	4,000	0,046	*
43	SCM268	1,440	0,230	ns
43	SCM9	4,000	0,261	ns
43	SCM120	14,000	0,526	ns
43	SCM28	9,000	0,174	ns
43	SCM86	14,000	0,526	ns
43	BARC176	9,000	0,174	ns
43	VMS159	20,000	0,172	ns
43	VMS182	8,444	0,586	ns
44-2	Xgwm261	0,120	0,729	ns
44-2	Xgwm408	3,000	0,392	ns
44-2	Xgwm577	3,000	0,392	ns
44-2	SCM138	3,000	0,083	ns
44-2	SCM268	3,000	0,083	ns
44-2	SCM9	12,000	0,285	ns
44-2	SCM120	NA	NA	
44-2	SCM28	NA	NA	
44-2	SCM86	3,000	0,083	ns
44-2	BARC176	NA	NA	
44-2	VMS159	3,000	0,392	ns
44-2	VMS182	4,500	0,609	ns
44	Xgwm261	0,082	0,775	ns
44	Xgwm408	4,000	0,261	ns
44	Xgwm577	4,000	0,261	ns
44	SCM138	4,000	0,046	*
44	SCM268	NA	NA	
44	SCM9	4,000	0,046	*
44	SCM120	4,000	0,677	ns
44	SCM28	5,000	0,172	ns
44	SCM86	12,000	0,285	ns
44	BARC176	0,082	0,775	ns
44	VMS159	4,000	0,261	ns
44	VMS182	4,000	0,046	*
45-1	Xgwm261	4,000	0,677	ns
45-1	Xgwm408	12,000	0,285	ns
45-1	Xgwm577	12,000	0,062	ns
45-1	SCM138	4,000	0,046	*
45-1	SCM268	0,082	0,775	ns
45-1	SCM9	12,000	0,679	ns
45-1	SCM120	8,444	0,586	ns
45-1	SCM28	20,000	0,172	ns

Vrsta/sorta/podvzorec	Lokus/marker	Vsota kvadratov	Verjetnost	Statistična značilnost
45-1	SCM86	20,000	0,172	ns
45-1	BARC176	6,667	0,756	ns
45-1	VMS159	12,000	0,679	ns
45-1	VMS182	8,000	0,046	*
45-2	Xgwm261	3,360	0,339	ns
45-2	Xgwm408	6,667	0,756	ns
45-2	Xgwm577	12,000	0,285	ns
45-2	SCM138	4,000	0,046	*
45-2	SCM268	NA	NA	
45-2	SCM9	12,000	0,679	ns
45-2	SCM120	14,000	0,526	ns
45-2	SCM28	16,000	0,382	ns
45-2	SCM86	20,000	0,521	ns
45-2	BARC176	14,000	0,526	ns
45-2	VMS159	6,667	0,353	ns
45-2	VMS182	0,444	0,505	ns
46-1	Xgwm261	0,444	0,931	ns
46-1	Xgwm408	4,000	0,261	ns
46-1	Xgwm577	4,000	0,261	ns
46-1	SCM138	4,000	0,046	*
46-1	SCM268	1,440	0,230	ns
46-1	SCM9	12,000	0,679	ns
46-1	SCM120	3,333	0,766	ns
46-1	SCM28	12,000	0,062	ns
46-1	SCM86	12,000	0,062	ns
46-1	BARC176	16,000	0,100	ns
46-1	VMS159	12,000	0,285	ns
46-1	VMS182	0,082	0,775	ns
46-2	Xgwm261	12,000	0,285	ns
46-2	Xgwm408	12,000	0,062	ns
46-2	Xgwm577	14,000	0,526	ns
46-2	SCM138	4,000	0,046	*
46-2	SCM268	4,000	0,046	*
46-2	SCM9	12,000	0,062	ns
46-2	SCM120	3,333	0,766	ns
46-2	SCM28	1,440	0,696	ns
46-2	SCM86	20,000	0,172	ns
46-2	BARC176	12,000	0,062	ns
46-2	VMS159	4,000	0,261	ns
46-2	VMS182	NA	NA	
48	Xgwm261	20,000	0,172	ns
48	Xgwm408	8,444	0,207	ns
48	Xgwm577	12,000	0,062	ns
48	SCM138	4,000	0,046	*
48	SCM268	4,000	0,046	*
48	SCM9	4,000	0,046	*
48	SCM120	4,000	0,046	*
48	SCM28	12,000	0,062	ns

Vrsta/sorta/podvzorec	Lokus/marker	Vsota kvadratov	Verjetnost	Statistična značilnost
48	SCM86	8,000	0,046	*
48	BARC176	16,444	0,353	ns
48	VMS159	8,000	0,046	*
48	VMS182	0,082	0,775	ns
49	Xgwm261	9,000	0,532	ns
49	Xgwm408	16,444	0,353	ns
49	Xgwm577	14,000	0,526	ns
49	SCM138	4,000	0,261	ns
49	SCM268	12,000	0,062	ns
49	SCM9	12,000	0,062	ns
49	SCM120	20,000	0,172	ns
49	SCM28	16,000	0,100	ns
49	SCM86	24,000	0,293	ns
49	BARC176	16,000	0,100	ns
49	VMS159	20,000	0,172	ns
49	VMS182	0,082	0,775	ns
50	Xgwm261	8,000	0,238	ns
50	Xgwm408	12,000	0,062	ns
50	Xgwm577	12,000	0,062	ns
50	SCM138	12,000	0,285	ns
50	SCM268	8,000	0,046	*
50	SCM9	4,000	0,261	ns
50	SCM120	12,000	0,285	ns
50	SCM28	20,000	0,172	ns
50	SCM86	12,000	0,679	ns
50	BARC176	1,000	0,317	ns
50	VMS159	1,000	0,317	ns
50	VMS182	1,000	0,317	ns
51	Xgwm261	0,444	0,931	ns
51	Xgwm408	4,000	0,677	ns
51	Xgwm577	8,000	0,046	*
51	SCM138	4,000	0,046	*
51	SCM268	4,000	0,046	*
51	SCM9	4,000	0,046	*
51	SCM120	2,222	0,528	ns
51	SCM28	12,000	0,062	ns
51	SCM86	12,000	0,285	ns
51	BARC176	NA	NA	
51	VMS159	NA	NA	
51	VMS182	NA	NA	
52	Xgwm261	0,444	0,505	ns
52	Xgwm408	4,000	0,261	ns
52	Xgwm577	16,000	0,100	ns
52	SCM138	4,000	0,046	*
52	SCM268	4,000	0,046	*
52	SCM9	8,000	0,046	*
52	SCM120	6,667	0,756	ns
52	SCM28	20,000	0,172	ns

Vrsta/sorta/podvzorec	Lokus/marker	Vsota kvadratov	Verjetnost	Statistična značilnost
52	BARC176	NA	NA	
52	VMS159	NA	NA	
52	VMS182	NA	NA	
53	Xgwm261	0,082	0,775	ns
53	Xgwm408	4,000	0,261	ns
53	Xgwm577	6,667	0,353	ns
53	SCM138	4,000	0,046	*
53	SCM268	12,000	0,062	ns
53	SCM9	8,000	0,046	*
53	SCM120	12,000	0,285	ns
53	SCM28	8,000	0,046	*
53	SCM86	12,000	0,285	ns
53	BARC176	NA	NA	
53	VMS159	NA	NA	
53	VMS182	NA	NA	
54	Xgwm261	1,440	0,696	ns
54	Xgwm408	12,000	0,062	ns
54	Xgwm577	12,000	0,285	ns
54	SCM138	4,000	0,046	*
54	SCM268	12,000	0,062	ns
54	SCM9	4,000	0,046	*
54	SCM120	4,000	0,261	ns
54	SCM28	12,000	0,062	ns
54	SCM86	12,000	0,285	ns
54	BARC176	NA	NA	
54	VMS159	NA	NA	
54	VMS182	NA	NA	

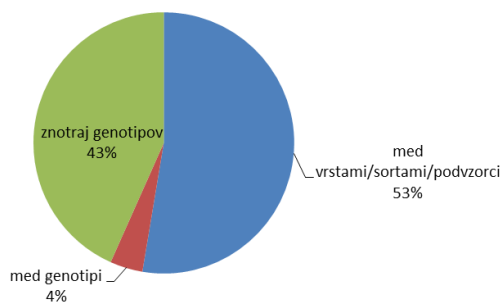
Legenda: ns=ni statistično značilno, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001; NA-vrstno specifičen marker

V Preglednici 6 so z zeleno označeni vrstno in/ali sortno specifični markerji, ki statistično značilno uspešno razločujejo med genomi pšenice, pire, rži in/ali znotraj njih. Z modro barvo so označeni vrstno specifični markerji, ki pa uspešno razločujejo med vrstami pšenice, pire in rži.

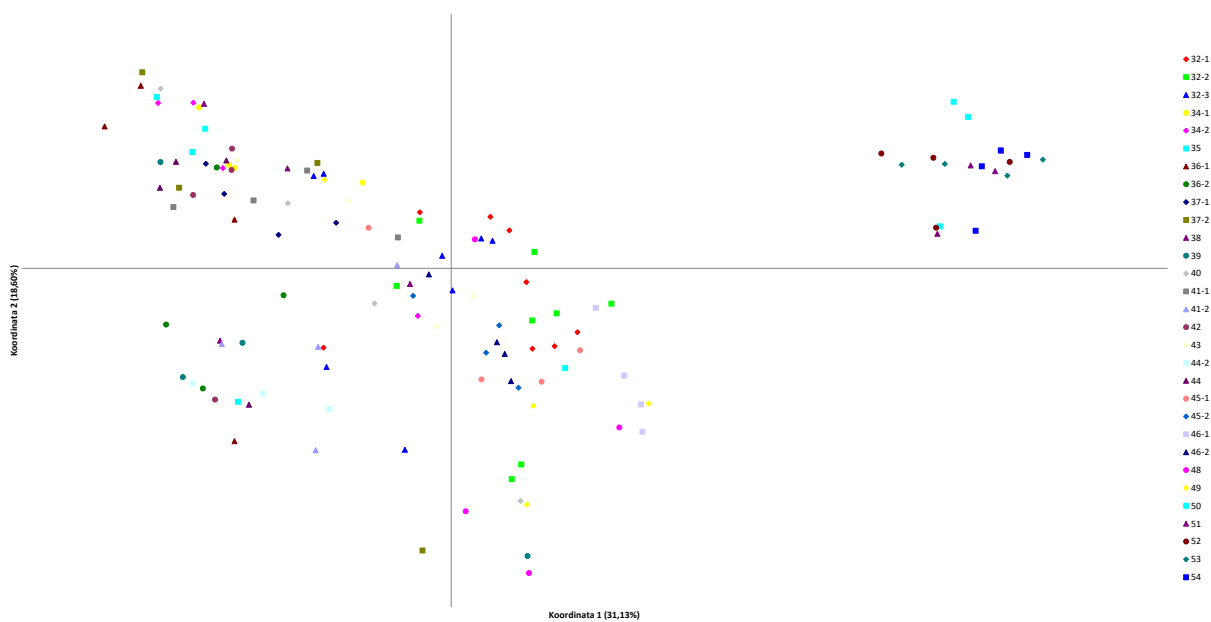
Preglednica 7: Podobnost med vrstami/sortami/podvzorci sorte pšenice, rži in pire na podlagi izračuna Nei-jeve gentske razdalje (Nei, 1972)

32-1	32-2	32-3	34-1	34-2	35	36-1	36-2	37-1	37-2	38	39	40	41-1	41-2	42	43	44-2	44	45-1	45-2	46-1	46-2	48	49	50	51	52	53	54	
1,000																														32-1
0,666	1,000																													32-2
0,756	0,790	1,000																												32-3
0,514	0,543	0,697	1,000																											34-1
0,486	0,425	0,570	0,821	1,000																										34-2
0,490	0,545	0,704	0,891	0,791	1,000																									35
0,502	0,522	0,685	0,782	0,722	0,855	1,000																								36-1
0,459	0,554	0,675	0,752	0,628	0,847	0,841	1,000																							36-2
0,436	0,541	0,587	0,728	0,680	0,747	0,756	0,732	1,000																						37-1
0,417	0,513	0,548	0,660	0,688	0,726	0,786	0,754	0,807	1,000																					37-2
0,419	0,471	0,521	0,631	0,631	0,719	0,765	0,771	0,775	0,811	1,000																				38
0,412	0,502	0,534	0,557	0,486	0,686	0,749	0,867	0,674	0,773	0,742	1,000																			39
0,499	0,573	0,602	0,687	0,684	0,731	0,732	0,719	0,777	0,806	0,734	0,729	1,000																		40
0,459	0,499	0,600	0,760	0,696	0,766	0,787	0,684	0,821	0,774	0,669	0,614	0,735	1,000																	41-1
0,474	0,496	0,504	0,514	0,481	0,612	0,702	0,779	0,651	0,688	0,768	0,847	0,679	0,591	1,000																41-2
0,402	0,499	0,563	0,721	0,630	0,753	0,789	0,787	0,860	0,783	0,725	0,789	0,782	0,798	0,712	1,000															42
0,521	0,561	0,540	0,634	0,618	0,667	0,700	0,630	0,825	0,774	0,736	0,686	0,849	0,769	0,677	0,778	1,000														43
0,391	0,517	0,578	0,560	0,414	0,687	0,722	0,853	0,635	0,612	0,647	0,878	0,601	0,566	0,834	0,723	0,554	1,000													44-2
0,470	0,564	0,712	0,843	0,689	0,893	0,858	0,844	0,781	0,689	0,688	0,717	0,732	0,782	0,646	0,810	0,683	0,775	1,000												44
0,503	0,572	0,556	0,565	0,476	0,544	0,568	0,544	0,579	0,598	0,564	0,544	0,656	0,631	0,504	0,562	0,683	0,465	0,565	1,000											45-1
0,435	0,584	0,528	0,543	0,511	0,560	0,596	0,557	0,601	0,638	0,597	0,537	0,663	0,641	0,491	0,588	0,657	0,449	0,575	0,814	1,000										45-2
0,523	0,605	0,551	0,471	0,364	0,430	0,466	0,481	0,494	0,461	0,442	0,490	0,584	0,533	0,479	0,478	0,583	0,452	0,494	0,724	0,729	1,000									46-1
0,493	0,513	0,500	0,470	0,522	0,486	0,525	0,397	0,505	0,548	0,432	0,436	0,675	0,610	0,385	0,450	0,650	0,290	0,476	0,682	0,700	0,661	1,000								46-2
0,452	0,461	0,370	0,315	0,378	0,363	0,457	0,488	0,417	0,535	0,504	0,600	0,573	0,401	0,634	0,431	0,546	0,499	0,371	0,562	0,619	0,650	0,575	1,000							48
0,461	0,532	0,434	0,424	0,446	0,447	0,538	0,504	0,581	0,609	0,545	0,615	0,718	0,568	0,601	0,549	0,716	0,511	0,487	0,677	0,676	0,684	0,684	0,779	1,000						49
0,401	0,519	0,410	0,350	0,316	0,294	0,375	0,345	0,394	0,412	0,397	0,386	0,472	0,419	0,409	0,378	0,476	0,353	0,331	0,558	0,612	0,689	0,507	0,538	0,583	1,000					50
0,486	0,611	0,545	0,482	0,296	0,453	0,414	0,477	0,507	0,416	0,471	0,452	0,532	0,503	0,479	0,487	0,562	0,482	0,510	0,583	0,568	0,726	0,443	0,495	0,578	0,617	1,000				51
0,443	0,608	0,515	0,491	0,328	0,475	0,437	0,504	0,525	0,460	0,477	0,501	0,526	0,567	0,495	0,537	0,607	0,491	0,551	0,630	0,626	0,725	0,508	0,476	0,542	0,600	0,862	1,000			52
0,474	0,569	0,512	0,492	0,286	0,417	0,411	0,453	0,499	0,418	0,435	0,453	0,480	0,521	0,447	0,505	0,564	0,461	0,512	0,583	0,552	0,732	0,443	0,432	0,527	0,609	0,887	0,879	1,000		53
0,435	0,493	0,420	0,410	0,233	0,351	0,339	0,397	0,424	0,339	0,379	0,419	0,420	0,425	0,408	0,415	0,481	0,443	0,419	0,506	0,480	0,652	0,366	0,472	0,557	0,606	0,866	0,796	0,864	1,000	54

S sivo označene celice pomenijo visoko stopnjo genske podobnosti (>0,83) med posameznimi vrstami/sortami/podvzorci.



Slika 3: Delež molekulske variabilnosti na podlagi R-statistike



Slika 4: Razporeditev genotipov pšenice, rži in pire na podlagi rezultatov analize glavnih koordinat (PCoA)

4 JEČMEN

Pri navadnem ječmenu smo opravili analizo sedmih sort. Sorte Barun, Bc Agram, Matej, Maxim, NS Roman in Zhana so vključevale eno analizno številko, medtem ko je sorta Novosadski 294 vključevala dve analizni številki. Vsaki analizni številki smo pripisali štiri individualne rastline, vsako s svojo laboratorijsko oznako genotipa (Preglednica 8).

4.1 Specifični materiali in metode v analizi

Preglednica 8: Seznam sort, analizne številke, število individualnih rastlin v analizi in laboratorijske oznake genotipov pri navadnem ječmenu

Sorta	Analizna številka	Število individualnih rastlin v analizi	Laboratorijska oznaka genotipa
Barun	1198-1/19	4	24a...24d
Bc Agram	1199-1/19	4	25a...25d
Matej	1201-1/19	4	27a...27d
Maxim	1202-1/19	4	28a...28d
Novosadski 294	1203-1/19 in 1203-2/19	4 + 4	29-1a...29-1d in 29-2a...29-2d
NS Roman	1204-1	4	30a...30d
Zhana	1205-1	4	31a...31d

Izolacijo genomske DNA posameznih vzorcev smo opravili na robotu za izolacijo nukleinskih kislin MagMax™ (Applied Biosystems). Uporabili smo kemikalije iz kompleta za izolacijo DNA BioSprint 15 DNA Plant (Qiagen). Izolacijo DNA smo izvedli po optimiziranem protokolu (opisan v Pipan in Meglič 2019). Pri genotipizaciji smo uporabili sedem markerjev, ki določajo nivo razlikovanja znotraj sort in med genotipi navadnega ječmena (Preglednica 9).

Preglednica 9: Seznam markerjev in njihove aplikacije pri navadnem ječmenu

Ime markerja + (oznaka v laboratoriju)	Tip markerja	Nivo razlikovanja	PCR protokol	Uporabljena kemija v PCR	Dolžinski standard v fragmentni analizi
<i>AM2 (ah)</i>	SSR	Raznolikost znotraj/med Avena in Hordeum vrstami/sortami	Piquemal	BT	ROX 350
<i>Bmac0093 (ai)</i>	SSR	Raznolikost znotraj Hordeum vrst/sort	Piquemal	QB	ROX 350
<i>Bmag0211 (aj)</i>	SSR	Raznolikost znotraj Hordeum vrst/sort	Piquemal	BT	ROX 350
<i>Bmag0009 (ak)</i>	SSR	Raznolikost znotraj Hordeum vrst/sort	SSR-tail	QB	ROX 350
<i>HvM36 (al)</i>	SSR	Raznolikost znotraj Hordeum vrst/sort	Piquemal	BT	ROX 350
<i>HvM54 (am)</i>	SSR	Raznolikost znotraj Hordeum vrst/sort	Piquemal	BT	ROX 350
<i>MGB371 (an)</i>		Raznolikost znotraj Hordeum vrst/sort	Modified Piquemal	BT	ROX 350

4.2 Rezultati analize kakovosti semena

Za analize številke navadnega ječmena smo zabeležili število semen, ki smo jih dali na test kalivosti, število normalnih, nenormalnih klic, mrtvih semen in delež normalnih, nenormalnih klic ter mrtvih semen (Preglednica 10). Semena in klice smo tudi fotografirali.

Preglednica 10: Podatki o številu semen, ki smo jih dali na test kalivosti, številu normalnih, nenormalnih klic, mrtvih semen in delež normalnih, nenormalnih klic in mrtvih semen za sorte navadnega ječmena

SORTA	Analizna številka	ŠT.SEME N na test kalivosti	REZULTATI - število klic/semen			REZULTATI - delež klic/semen (%)		
			NORMAL NE klice	NENORMAL NE klice	MRTV A semena	NORMAL NE klice	NENORMAL NE klice	MRTV A semena
Barun	1198-1/19	50	34	2	14	68	4	28
Bc Agram	1199-1/19	50	45	0	5	90	0	10
Matej	1201-1/19	50	24	7	19	48	14	38
Maxim	1202-1/19	50	49	0	1	98	0	2
Novosadski 294	1203-1/19	50	50	0	0	100	0	0
Novosadski 294	1203-2/19	7	7	0	0	100	0	0
NS Roman	1204-1/19	50	48	0	2	96	0	4
Zhana	1205-1/19	50	47	0	3	94	0	6

1.) Barun: kalivost semen z analizno številko 1198-1/19 je bila 68 % (razvoj normalnih klic).



2.) Bc Agram: kalivost semen z analizno številko 1199-1/19 je bila 90 %.



3.) Matej: kalivost semen z analizno številko 1201-1/19 je bila 48 %.



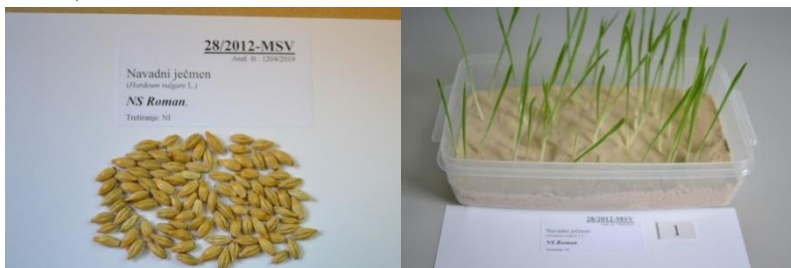
4.) Maxim: kalivost semen z analizno številko 1202-1/19 je bila 98 %.



5.) Novosadski 294: kalivost semen z analiznima številčkama 1203-1/19 (1) in 1203-2/19 (2) je bila v obeh primerih 100 %.



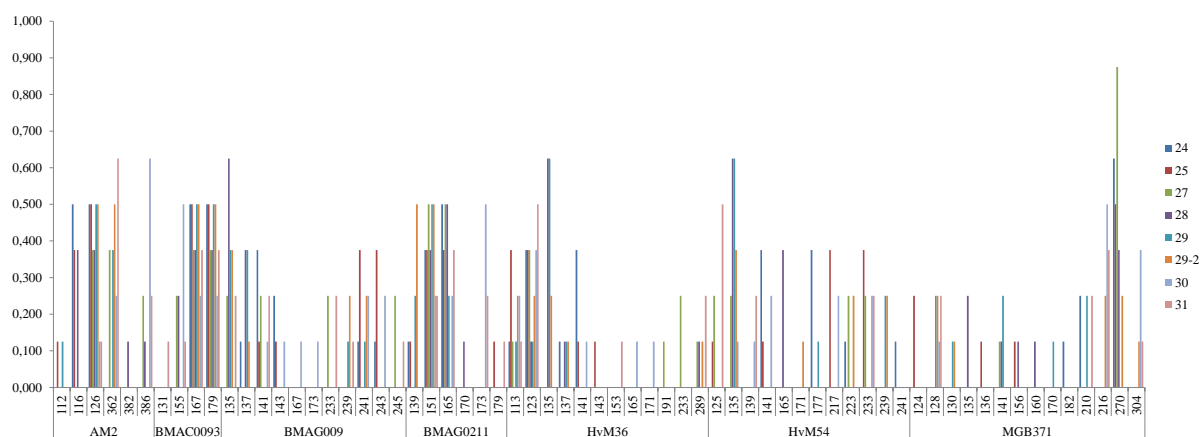
6.) NS Romana: kalivost semen z analizno številko 1204-1/19 je bila 96 %.



7.) Zhana: kalivost semen z analizo številko 1205-1/19 je bila 94 %.



4.3 Rezultati genetske analize



Slika 5: Frekvenca posameznih alelov po lokusih glede na sorto/podvzorec ječmena

Preglednica 11: Ustreznost posameznega markerja za razločevanje med sortami/podvzorci ječmena ter zmožnost ločevanja znotraj njih glede na rezultate Hardy-Weinbergovega ravnotežja

Sorta/podvzorec	Lokus/marker	Vsota kvadratov	Verjetnost	Statistična značilnost
24	AM2	4,000	0,046	*
24	BMAC0093	4,000	0,046	*
24	BMAG009	12,000	0,285	ns
24	BMAG0211	4,000	0,261	ns
24	HvM36	4,889	0,558	ns
24	HvM54	12,000	0,062	ns
24	MGB371	4,160	0,245	ns
25	AM2	4,000	0,261	ns
25	BMAC0093	4,000	0,046	*
25	BMAG009	12,000	0,062	ns
25	BMAG0211	4,889	0,558	ns
25	HvM36	12,000	0,062	ns
25	HvM54	12,000	0,062	ns
25	MGB371	8,000	0,238	ns
27	AM2	8,000	0,046	*
27	BMAC0093	8,000	0,046	*
27	BMAG009	12,000	0,062	ns
27	BMAG0211	4,000	0,046	*
27	HvM36	8,000	0,629	ns

Sorta/podvzorec	Lokus/marker	Vsota kvadratov	Verjetnost	Statistična značilnost
27	HvM54	12,000	0,062	ns
27	MGB371	0,082	0,775	ns
28	AM2	12,000	0,062	ns
28	BMAC0093	8,000	0,046	*
28	BMAG009	1,440	0,230	ns
28	BMAG0211	4,000	0,261	ns
28	HvM36	1,440	0,963	ns
28	HvM54	1,440	0,230	ns
28	MGB371	11,111	0,349	ns
29	AM2	4,000	0,261	ns
29	BMAC0093	4,000	0,046	*
29	BMAG009	12,000	0,062	ns
29	BMAG0211	4,000	0,261	ns
29	HvM36	8,160	0,227	ns
29	HvM54	4,160	0,245	ns
29	MGB371	10,000	0,440	ns
29-2	AM2	4,000	0,046	*
29-2	BMAC0093	4,000	0,046	*
29-2	BMAG009	8,444	0,207	ns
29-2	BMAG0211	4,000	0,046	*
29-2	HvM36	12,000	0,285	ns
29-2	HvM54	8,444	0,207	ns
29-2	MGB371	10,000	0,440	ns
30	AM2	3,360	0,339	ns
30	BMAC0093	8,000	0,046	*
30	BMAG009	20,000	0,172	ns
30	BMAG0211	8,000	0,046	*
30	HvM36	12,000	0,285	ns
30	HvM54	16,000	0,100	ns
30	MGB371	4,000	0,261	ns
31	AM2	4,160	0,245	ns
31	BMAC0093	12,000	0,062	ns
31	BMAG009	12,000	0,285	ns
31	BMAG0211	8,000	0,238	ns
31	HvM36	4,000	0,677	ns
31	HvM54	8,000	0,046	*
31	MGB371	8,000	0,238	ns

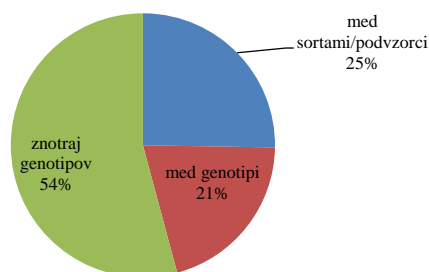
Legenda: ns=ni statistično značilno, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001;

V Preglednici 11 so z zeleno označeni sortno specifični markerji, ki statistično značilno uspešno razločujejo med sortami ječmena in/ali znotraj njih.

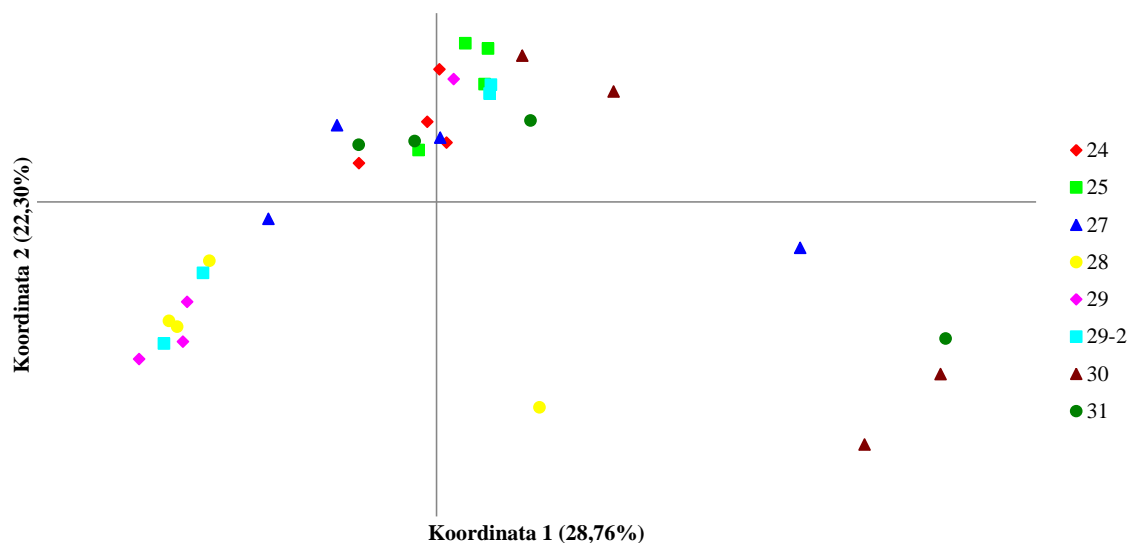
Preglednica 12: Podobnost med sortami/podvzorci ječmena na podlagi izračuna Nei-jeve gentske razdalje (Nei, 1972)

24	25	27	28	29	29-2	30	31	
1,000								24
0,781	1,000							25
0,669	0,659	1,000						27
0,534	0,483	0,605	1,000					28
0,491	0,467	0,523	0,757	1,000				29
0,524	0,563	0,617	0,595	0,833	1,000			29-2
0,393	0,497	0,464	0,308	0,326	0,432	1,000		30
0,430	0,465	0,646	0,364	0,483	0,569	0,644	1,000	31

S sivo označene celice v Preglednici 12 pomenijo visoko stopnjo genetske podobnosti (>0,83) med posameznimi sortami/podvzorci ječmena.



Slika 6: Delež molekulske variabilnosti na podlagi R-statistike



Slika 7: Razporeditev genotipov pšenice, rži in pira na podlagi rezultatov analize glavnih koordinat (PCoA)

5 OVES

Pri navadnem in golem ovsu smo opravili analize na sortah Noni in Kamil. Sorta Noni je vključevala eno analizno številko (tj. en fenotip semen) s štirimi individualnimi rastlinami. Pri sorti Kamil smo za genotipizacijo uporabili izolirano DNA iz preteklih internih preverjanj v genetskem laboratoriju. Uporabili smo štiri vzorce različnih individualnih rastlin in jim pripisali laboratorijsko oznako genotipa (

Preglednica 3). Ker smo pri sorti Kamil uporabili predhodno izolirano DNA, o analizni številki za kakovost semena/klic nimamo podatka.

5.1 Specifični/e materiali in metode v analizi

Preglednica 13: Seznam sort, analizne številke, število individualnih rastlin v analizi in laboratorijske oznake genotipov pri analizi navadnega in golega ovsa (NP= ni podatka)

- Navadni oves

Sorta	Analizna številka	Število individualnih rastlin v analizi	Laboratorijska oznaka genotipa
Noni	1176-1/19	4	1-1a...1-1d

- Goli oves

Sorta	Analizna številka	Število individualnih rastlin v analizi	Laboratorijska oznaka genotipa
Kamil	NP	4	47a...47d

Izolacijo genske DNA posameznih vzorcev smo opravili na robotu za izolacijo nukleinskih kislin MagMax™ (Applied Biosystems). Uporabili smo kemikalije iz kompleta za izolacijo DNA BioSprint 15 DNA Plant (Qiagen). Izolacijo DNA smo izvedli po optimiziranem protokolu (po Pipan in Meglič 2019). Pri genotipizaciji smo uporabili sedem markerjev, ki določajo nivo razlikovanja med vrstami in sortami navadnega in golega ovsa (Preglednica 14).

Preglednica 24: Seznam markerjev in njihove aplikacije pri navadnem in golem ovsu

Ime markerja (oznaka v laboratoriju)	Tip markerja	Nivo razlikovanja	PCR protokol	Uporabljena kemija v PCR	Dolžinski standard v fragmentni analizi
AM11 (aa)	SSR	Raznolikost znotraj in med Avena vrstami/sortami. Razločevanje med navadnim in golim ovsom	Piquemal	QB	ROX 350
AM14 (ab)	SSR	Raznolikost znotraj in med Avena vrstami/sortami. Razločevanje med navadnim in golim ovsom	Modified Piquemal	BT	ROX 350
AM4 (ac)	SSR	Raznolikost znotraj rodu Avena	Piquemal	QB	ROX 350
AM1 (ae)	SSR	Raznolikost znotraj rodu Avena	Piquemal	BT	ROX 350
AM03 (af)	SSR	Raznolikost znotraj rodu Avena	Piquemal	BT	ROX 350
Bmag0120 (ag)	SSR	Raznolikost znotraj rodu Avena in razločevanje netipičnih genotipov znotraj sort	Modified Piquemal	QB	ROX 350
AM2 (ah)	SSR	Raznolikost znotraj rodu Avena in Hordeum	Piquemal	BT	ROX 350

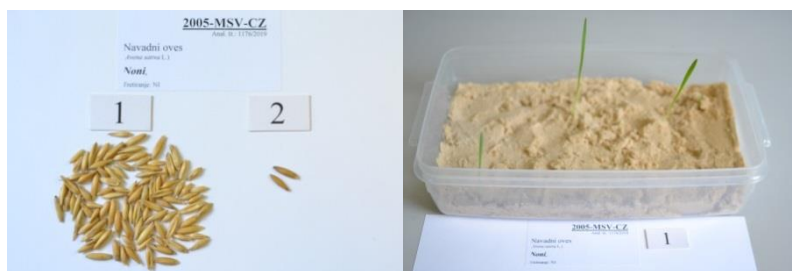
5.2 Rezultati analize kakovosti semena

Za analizo številko navadnega ovsa smo zabeležili število semen, ki smo jih dali na test kalivosti, število normalnih, nenormalnih klic, mrtvih semen in delež normalnih, nenormalnih klic ter mrtvih semen (Preglednica 15). Semena in klice smo tudi fotografirali.

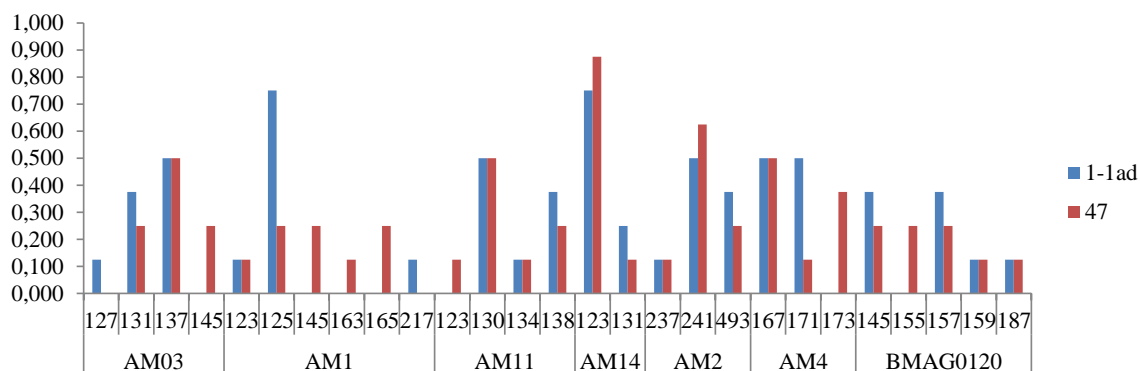
Preglednica 15: Podatki o številu semen, ki smo jih dali na test kalivosti, številu normalnih, nenormalnih klic, mrtvih semen in delež normalnih, nenormalnih klic in mrtvih semen za sorte navadnega ovsa

SORT A	Analizna številka	ŠT.SEM EN na test kalivosti	REZULTATI - število klic/semen			REZULTATI - delež klic/semen (%)		
			NORMALN E klice	NENORMALN E klice	MRTV A semena	NORMALN E klice	NENORMALN E klice	MRTV A semena
Noni	1176-1	50	4	0	46	8	0	92
Noni	1176-2	2	0	0	2	0	0	100

Noni: kalivost semen z analiznima številka 1176-1 (1) in 1176-2 (2) je bila 8 in 0 % (razvoj normalnih klic).



5.3 Rezultati genetske analize



Slika 8: Frekvenca posameznih alelov po lokusih glede na vrsto ovsa

Preglednica 16: Ustreznost posameznega markerja za razločevanje med sortama ovsa ter zmožnost ločevanja znotraj njih glede na rezultate Hardy-Weinbergovega ravnotežja

Sorta/podvzorec sorte	Lokus/marker	Vsota kvadratov	Verjetnost	Statistična značilnost
1-1ad	AM03	4,000	0,261	ns
1-1ad	AM1	0,444	0,931	ns
1-1ad	AM11	4,000	0,261	ns
1-1ad	AM14	0,444	0,505	ns
1-1ad	AM2	4,000	0,261	ns
1-1ad	AM4	4,000	0,046	*
1-1ad	BMAG0120	12,000	0,062	ns
47	AM03	4,000	0,261	ns
47	AM1	12,000	0,285	ns
47	AM11	4,000	0,677	ns
47	AM14	0,082	0,775	ns
47	AM2	1,440	0,696	ns
47	AM4	4,000	0,261	ns
47	BMAG0120	12,000	0,285	ns

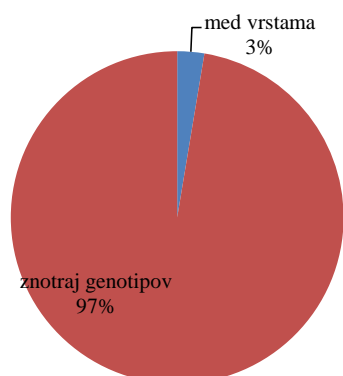
Legenda: ns=ni statistično značilno, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001;

Na podlagi rezultatov iz Preglednice 16 sklepamo, da gre izrazito podobnost med obema sortama golega in navadnega ovsa na analiziranih lokusih, in da se je marker AM4 (v Preglednici 16 označen z zeleno) izkazal kot najbolj informativen in statistično značilen za razlikovanje.

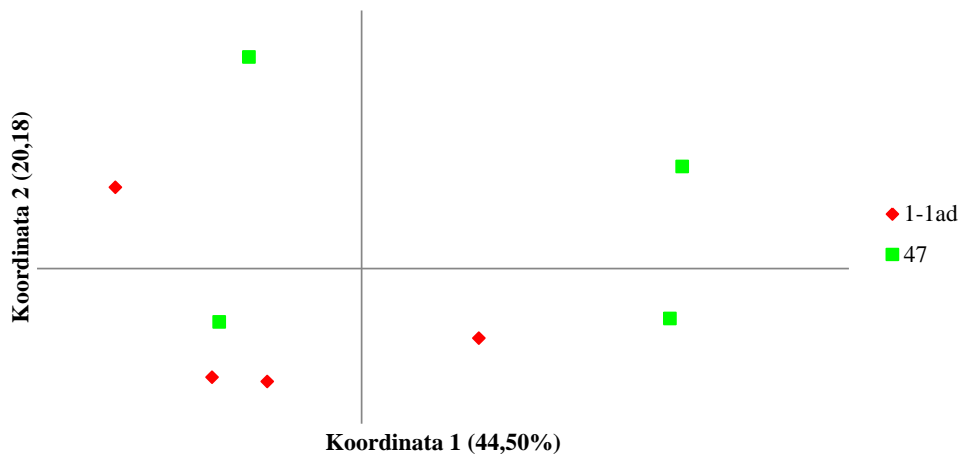
Preglednica 17: Podobnost med vrstama ovsa na podlagi izračuna Nei-jeve genske razdalje (Nei, 1972)

1-1ad	47	
1,000		1-1ad
0,842	1,000	47

S sivo označena celica v Preglednici 17 pomeni visoko stopnjo genske podobnosti (>0,83) med posameznimi vrstama/sortama ovsa.



Slika 9: Delež molekulske variabilnosti na podlagi R-statistike



Slika 10: Razporeditev genotipov dveh vrst ovsa na podlagi rezultatov analize glavnih koordinat (PCoA)

6 AJDA

V analizo smo vključili štiri sorte navadne ajde: Bamby, Čebelica, Darja in Trdinova. Sorti Čebelica in Trdinova sta vključevali po eno analizno številko (en fenotip semen), sorta Čebelica dve in sorta Darja tri analizne številke. Vsaki analizni številki smo pripisali po osem individualnih rastlin s pripadajočimi oznakami genotipov (Preglednica 18).

Pri tatarski ajdi smo obravnavali sorti Radohova in Zlata. Sorta Zlata je imela eno, Radohova pa dve analizni številki. Za vsako analizno številko smo imeli štiri individualne rastline (Preglednica 18).

6.1 Specifični/e materiali in metode v analizi

Preglednica 18: Seznam sort, analizne številke, število individualnih rastlin v analizi in laboratorijske oznake genotipov pri analizi navadne in tatarske ajde

- Navadna ajda

Sorta	Analizna številka	Število individualnih rastlin v analizi	Laboratorijska oznaka genotipa
Bamby	1192-1/19 in 1192-2/19	8 + 8	18-1a...18-1h in 18-2a...18-2h
Čebelica	1193-1/19	8	19a...19h
Darja	1194-1/19, 1194-2/19 in 1194-3/19	8 + 8 + 8	20-1a...20-1h, 20-2a...20-2h in 20-3a...20-3h
Trdinova	1195-1/19	8	21-1a...21-1h

- Tatarska ajda

Sorta	Analizna številka	Število individualnih rastlin v analizi	Laboratorijska oznaka genotipa
Radohova	1196-1/19 in 1196-2/19	4 + 4	22-1a...22-1d in 22-2a...22-2d
Zlata	1197-1/19	4	23a-23d

Izolacijo DNA posameznih vzorcev smo opravili s kitom DNeasy Plant Pro Kit (Qiagen), brez dodatka PS po protokolu (po Pipan in sod., 2018).

V analizi smo uporabili enajst markerjev, ki določajo nivo razlikovanja znotraj ali med vrstama navadne in tatarske ajde (Preglednica 19).

Preglednica 19: Seznam markerjev in njihove aplikacije pri navadni in tatarski ajdi

Ime markerja (oznaka v laboratoriju)	Tip markerja	Nivo razlikovanja	PCR protokol	Uporabljena kemija v PCR	Dolžinski standard v fragmentni analizi
<i>GB-FE-001(n)</i>	SSR	Razločevanje med navadno in tatarsko ajdo	Piquemal	BT	ROX 500
<i>GB-FE-025(o)</i>	SSR	Razločevanje med navadno in tatarsko ajdo	Modified Piquemal	BT	ROX 500
<i>GE-FE-121(p)</i>	SSR	Razločevanje med navadno in tatarsko ajdo	Piquemal	BT	ROX 500
<i>GB-FE-114(r)</i>	SSR	Ustrezno polimorfen znotraj navadne in hkrati tatarske ajde; primeren za analizo raznolikosti znotraj obeh ajd	Piquemal	BT	ROX 500
<i>GB-FE-121(s)</i>	SSR	Ustrezno polimorfen znotraj navadne in hkrati tatarske ajde; primeren za analizo raznolikosti znotraj obeh ajd	Piquemal	BT	ROX 500

Ime markerja (oznaka v laboratoriju)	Tip markerja	Nivo razlikovanja	PCR protokol	Uporabljena kemija v PCR	Dolžinski standard v fragmentni analizi
GB-FE-035(t)	SSR	Visoko polimorfen za analizo raznolikosti znotraj navadne ajde	Piquemal	BT	ROX 500
GB-FE-054(u)	SSR	Visoko polimorfen za analizo raznolikosti znotraj navadne ajde	Modified Piquemal	BT	ROX 500
GB-FE-014(v)	SSR	Visoko polimorfen za analizo raznolikosti znotraj navadne ajde	SSR-tail	BT	ROX 500
TBP5(z)	SSR	Visoko polimorfen za analizo raznolikosti znotraj navadne ajde	Piquemal	BT	ROX 500
TBP9(x)	SSR	Visoko polimorfen za analizo raznolikosti znotraj navadne ajde	Piquemal	BT	ROX 500
TBP6(y)	SSR	Visoko polimorfen za analizo raznolikosti znotraj navadne ajde	Piquemal	BT	ROX 500

6.2 Rezultati analize kakovosti semena

Za vsako analizno številko navadne in tatarske ajde smo zabeležili število semen, ki smo jih dali na test kalivosti, število normalnih, nenormalnih klic, mrtvih semen in delež normalnih, nenormalnih klic ter mrtvih semen (Preglednica 20, 21). Semena in klice smo tudi fotografirali.

- Navadna ajda

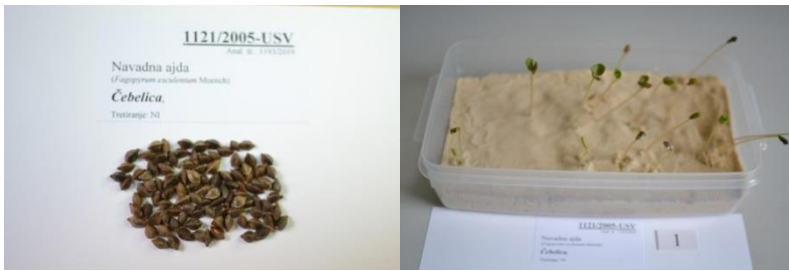
Preglednica 20: Podatki o številu semen, ki smo jih dali na test kalivosti, številu normalnih in nenormalnih klic, mrtvih semen ter delež normalnih in nenormalnih klic in mrtvih semen za sorte navadne ajde

Sorta	Analizna številka	ŠT.SEME N na test kalivosti	REZULTATI - število klic/semen			REZULTATI - delež klic/semen (%)		
			NORMALN E klice	NENORMALN E klice	MRTV A semena	NORMALN E klice	NENORMALN E klice	MRTV A semena
Bamby	1192-1/19	50	43	0	7	86	0	14
Bamby	1192-2/19	43	40	0	3	93	0	7
Čebelica	1193-1/19	50	19	0	31	38	0	62
Darja	1194-1/19	50	36	0	14	72	0	28
Darja	1194-2/19	13	11	0	2	85	0	15
Darja	1194-3/19	16	12	1	3	75	6	19
Trdinov a	1195-1/19	50	33	0	17	66	0	34
Trdinov a	1195-2/19	1	0	0	1	0	0	100

- 1.) Bamby: imeli smo dva fenotipa semen; kalivost semen z analiznima številka 1192-1/19 (1) in 1192-2/19 (2) je bila 86 % in 93 % (razvoj normalnih klic).



2.) Čebelica: kalivost semen z analizno številko 1193-1/19 je bila 38 %.



3.) Darja: imeli smo tri fenotipe semen; kalivost semen z analiznimi številkami 1194-1/19 (1), 1194-2/19 (2) in 1194-3/19 (3) je bila 72 %, 85 % in 75 %.



4.) Trdinova: kalivost semen z analiznima številkama 1195-1/19 (1) in 1195-2/19 (2) je bila 66 % oz. 0 %.



- Tatarska ajda

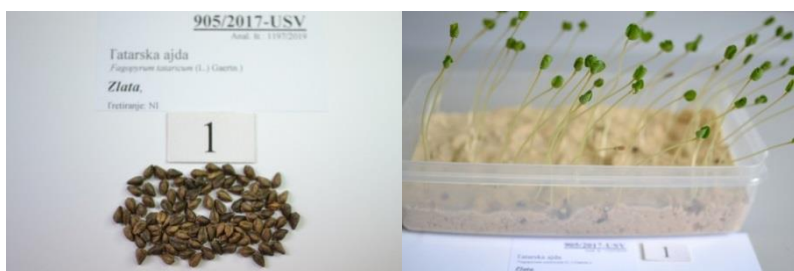
Preglednica 21: Podatki o številu semen, ki smo jih dali na test kalivosti, številu normalnih, nenormalnih klic, mrtvih semen in delež normalnih, nenormalnih klic in mrtvih semen za sorte tatarske ajde

SORTA	Anali zna števil ka	ŠT.SEME N na test kalivosti	REZULTATI - število klic/semen			REZULTATI - delež klic/semen (%)		
			NORMALN E klice	NENORMALN E klice	MRTV A semena	NORMALN E klice	NENORMALN E klice	MRTV A semena
Radohova	1196- 1/19	50	50	0	0	100	0	0
Radohova	1196- 2/19	16	13	0	3	81	0	19
Zlata	1197- 1/19	50	46	0	4	92	0	8

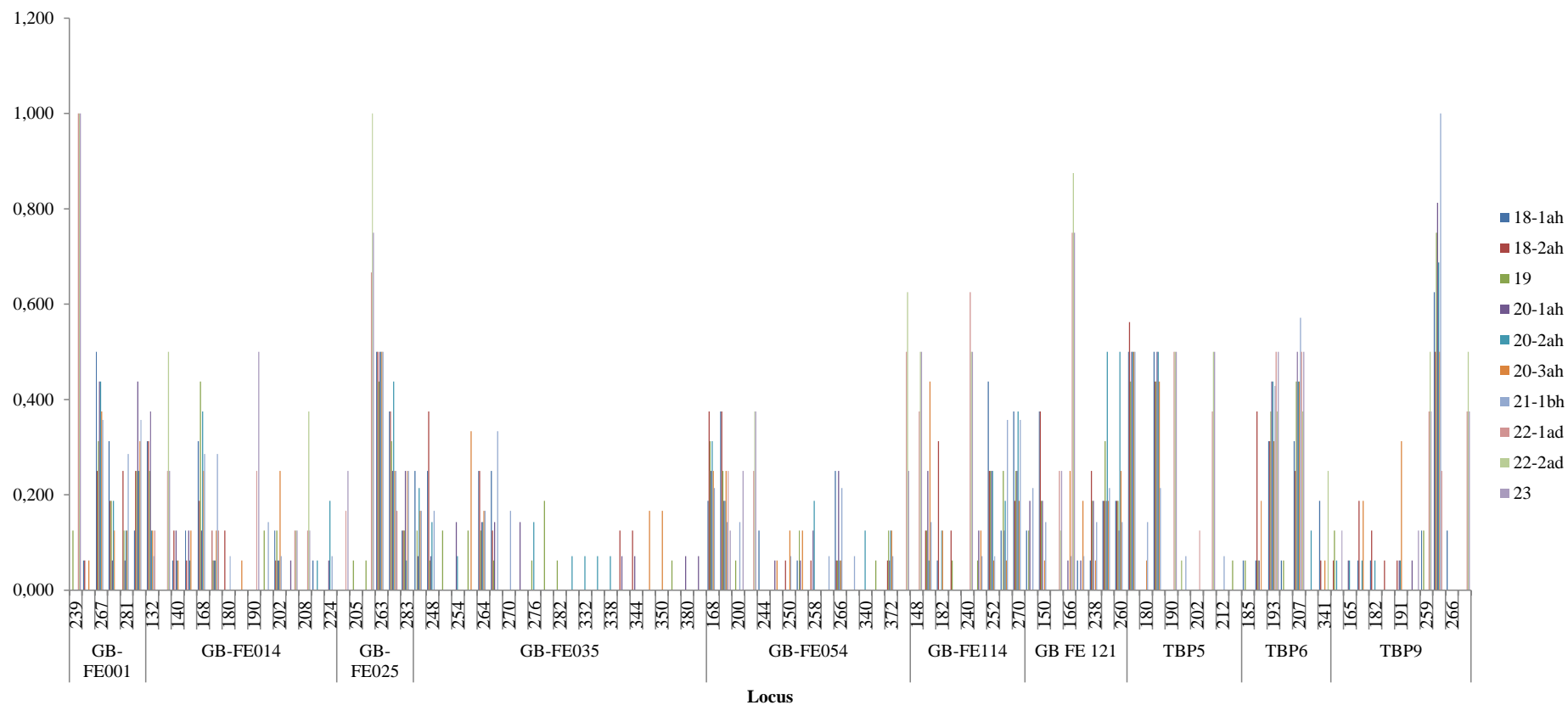
- 1.) Radohova: kalivost semen z analiznima številka 1169-1/19 (1) in 1169-2/19 (2) je bila 100 % in 81 % (razvoj normalnih klic).



- 2.) Zlata: kalivost semen z analizno številko 1197-1/19 je bil 92 %.



6.3 Rezultati genetske analize



Slika 11: Frekvenca posameznih alelov po lokusih glede na vrsto/sorto/podvzorec ajde

Preglednica 22: Ustreznost posameznega markerja za razločevanje med vrstama ajde ter zmožnost ločevanja znotraj njiju glede na rezultate Hardy-Weinbergovega ravnotežja

Vrsta/sorta/podvzorec	Lokus/marker	Vsota kvadratov	Verjetnost	Statistična značilnost
18-1ah	GB-FE001	8,000	0,238	ns
18-1ah	GB-FE014	15,840	0,393	ns
18-1ah	GB-FE025	8,000	0,046	*
18-1ah	GB-FE035	6,000	0,423	ns
18-1ah	GB-FE054	10,889	0,366	ns
18-1ah	GB-FE114	6,286	0,392	ns
18-1ah	GB FE 121	19,556	0,190	ns
18-1ah	TBP5	8,000	0,005	**
18-1ah	TBP6	32,889	0,005	**
18-1ah	TBP9	24,320	0,007	**
18-2ah	GB-FE001	12,667	0,243	ns
18-2ah	GB-FE014	23,822	0,302	ns
18-2ah	GB-FE025	8,000	0,046	*
18-2ah	GB-FE035	12,444	0,256	ns
18-2ah	GB-FE054	24,444	0,058	ns
18-2ah	GB-FE114	17,600	0,062	ns
18-2ah	GB FE 121	19,556	0,003	**
18-2ah	TBP5	4,840	0,028	*
18-2ah	TBP6	11,556	0,073	ns
18-2ah	TBP9	32,000	0,006	**
19	GB-FE001	20,800	0,023	*
19	GB-FE014	11,224	0,340	ns
19	GB-FE025	24,000	0,008	**
19	GB-FE035	56,000	0,126	ns
19	GB-FE054	34,400	0,033	*
19	GB-FE114	17,000	0,319	ns
19	GB FE 121	15,324	0,121	ns
19	TBP5	24,000	0,001	***
19	TBP6	24,000	0,008	**
19	TBP9	16,000	0,001	**
20-1ah	GB-FE001	8,327	0,215	ns
20-1ah	GB-FE014	40,000	0,066	ns
20-1ah	GB-FE025	8,000	0,046	*
20-1ah	GB-FE035	52,500	0,206	ns
20-1ah	GB-FE054	23,333	0,326	ns
20-1ah	GB-FE114	10,000	0,440	ns
20-1ah	GB FE 121	20,444	0,493	ns
20-1ah	TBP5	8,000	0,005	**
20-1ah	TBP6	8,000	0,046	*
20-1ah	TBP9	16,047	0,014	*
20-2ah	GB-FE001	9,796	0,134	ns
20-2ah	GB-FE014	18,222	0,920	ns
20-2ah	GB-FE025	8,000	0,046	*
20-2ah	GB-FE035	49,000	0,073	ns
20-2ah	GB-FE054	19,911	0,175	ns
20-2ah	GB-FE114	16,000	0,100	ns
20-2ah	GB FE 121	8,000	0,005	**
20-2ah	TBP5	8,000	0,005	**
20-2ah	TBP6	16,000	0,001	**
20-2ah	TBP9	16,595	0,344	ns
20-3ah	GB-FE001	11,200	0,342	ns
20-3ah	GB-FE014	23,000	0,344	ns
20-3ah	GB-FE025	8,000	0,046	*

Vrsta/sorta/podvzorec	Lokus/marker	Vsota kvadratov	Verjetnost	Statistična značilnost
20-3ah	GB-FE035	12,000	0,285	ns
20-3ah	GB-FE054	12,000	0,940	ns
20-3ah	GB-FE114	11,810	0,693	ns
20-3ah	GB FE 121	18,667	0,229	ns
20-3ah	TBP5	8,000	0,046	*
20-3ah	TBP6	12,971	0,044	*
20-3ah	TBP9	10,880	0,012	*
21-1bh	GB-FE001	9,240	0,026	*
21-1bh	GB-FE014	28,875	0,117	ns
21-1bh	GB-FE025	6,000	0,112	ns
21-1bh	GB-FE035	9,000	0,532	ns
21-1bh	GB-FE054	34,222	0,194	ns
21-1bh	GB-FE114	28,000	0,002	**
21-1bh	GB FE 121	21,389	0,435	ns
21-1bh	TBP5	22,286	0,014	*
21-1bh	TBP6	3,938	0,047	*
21-1bh	TBP9	NA	NA	
22-1ad	GB-FE001	NA	NA	
22-1ad	GB-FE014	14,000	0,526	ns
22-1ad	GB-FE025	0,750	0,861	ns
22-1ad	GB-FE035	NA	NA	
22-1ad	GB-FE054	5,000	0,172	ns
22-1ad	GB-FE114	1,440	0,230	ns
22-1ad	GB FE 121	0,444	0,505	ns
22-1ad	TBP5	4,000	0,261	ns
22-1ad	TBP6	4,000	0,046	*
22-1ad	TBP9	8,000	0,046	*
22-2ad	GB-FE001	NA	NA	
22-2ad	GB-FE014	4,000	0,261	ns
22-2ad	GB-FE025	NA	NA	
22-2ad	GB-FE035	NA	NA	
22-2ad	GB-FE054	1,440	0,230	ns
22-2ad	GB-FE114	4,000	0,046	*
22-2ad	GB FE 121	0,082	0,775	ns
22-2ad	TBP5	4,000	0,046	*
22-2ad	TBP6	8,000	0,046	*
22-2ad	TBP9	4,000	0,046	*
23	GB-FE001	NA	NA	
23	GB-FE014	8,000	0,238	ns
23	GB-FE025	0,444	0,505	ns
23	GB-FE035	NA	NA	
23	GB-FE054	6,667	0,353	ns
23	GB-FE114	4,000	0,046	*
23	GB FE 121	0,444	0,505	ns
23	TBP5	4,000	0,046	*
23	TBP6	4,000	0,046	*
23	TBP9	12,000	0,062	ns

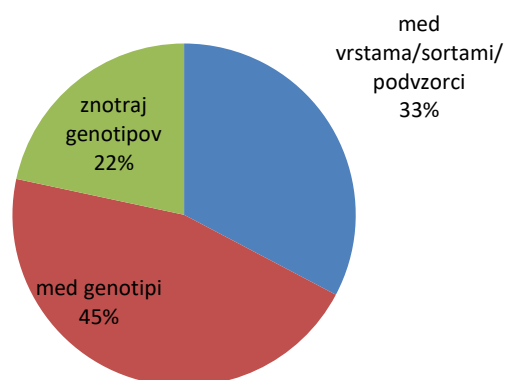
Legenda: ns=ni statistično značilno, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001; NA-vrstno specifičen marker

V Preglednici 22 so z zeleno označeni vrstno in/ali sortno specifični markerji, ki statistično značilno uspešno razločujejo med genomoma navadne in tatarske ajde in/ali znotraj njiju. Z modro barvo so označeni vrstno specifični markerji, ki pa uspešno razločujejo tudi med vrstama navadne in tatarske ajde.

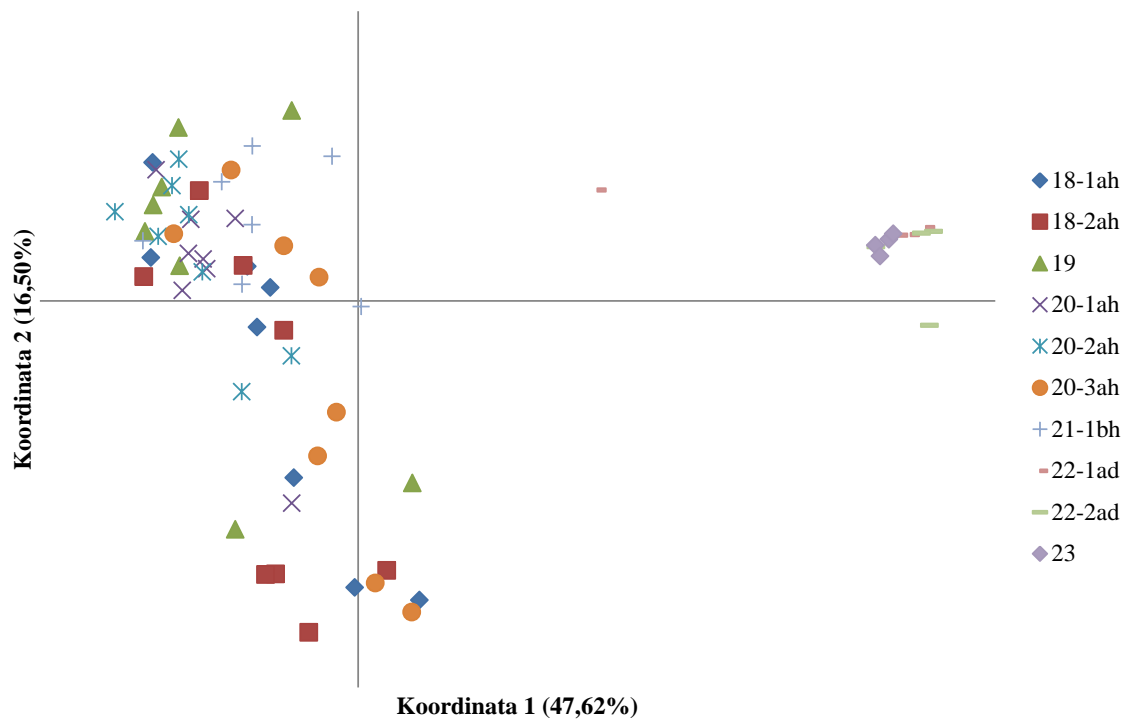
Preglednica 23: Podobnost med vrstama/sortami/podvzorci ajde na podlagi izračuna Nei-jeve gentske razdalje (Nei, 1972)

18-1ah	18-2ah	19	20-1ah	20-2ah	20-3ah	21-1bh	22-1ad	22-2ad	23
1,000									18-1ah
0,859	1,000								18-2ah
0,879	0,825	1,000							19
0,868	0,831	0,894	1,000						20-1ah
0,851	0,803	0,893	0,855	1,000					20-2ah
0,767	0,791	0,825	0,842	0,809	1,000				20-3ah
0,801	0,753	0,878	0,886	0,825	0,780	1,000			21-1bh
0,186	0,169	0,267	0,228	0,192	0,230	0,232	1,000		22-1ad
0,081	0,056	0,138	0,097	0,075	0,129	0,098	0,930	1,000	22-2ad
0,104	0,090	0,186	0,142	0,117	0,162	0,148	0,951	0,915	1,000 23

S sivo označene celice v Preglednici 23 pomenijo visoko stopnjo genetske podobnosti (>0,83) med vrstama/sortami/podvzorci navadne in tatarske ajde.



Slika 12: Delež molekulske variabilnosti na podlagi R-statistike



Slika 13: Razporeditev genotipov ajde na podlagi rezultatov analize glavnih koordinat (PCoA)

7 KRIŽNICE

Pri navadni ogrščici smo opravili analizo na petnajstih sortah. Pri sortah Daniela, PR46W24, PT200CL, PT228CL, PT240CL, PX113, PX125CL in Starška smo imeli po eno analizno številko, ki smo ji pripisali osem individualnih rastlin s svojo laboratorijsko oznako genotipa. Pri sortah PR45D03, PR45D05, PR46W14, PR46W15, PT211, PT234, PX104 smo imeli po dve analizni številki, ki smo jima prav tako pripisali osem (oziroma v nekaterih primerih manj) individualnih rastlin.

Pri beli gorjušici smo opravili analizo na sorti Torpedo, kjer smo imeli po dve analizni številki s pripadajočimi oznakami genotipov (Preglednica 24).

7.1 Specifični/e materiali in metode v analizi

- Navadna ogrščica

Preglednica 24: Seznam sort, analizne številke, število individualnih rastlin v analizi in laboratorijske oznake genotipov pri navadni ogrščici in beli gorjušici

Sorta	Analizna številka	Število individualnih rastlin v analizi	Laboratorijska oznaka genotipa
Daniela	1177-1/19	8	2a...2h
PR45D03	1178-1/19 in 1178-2/19	8 + 8	3-1a...3-1h in 3-2a...3-2h
PR45D05	1179-1/19 in 1179-2/19	8 + 5	4-1a...4-1h in 4-2a...4-2e
PR46W14	1180-1/19 in 1180-2/19	8 + 3	5-1a...5-1h in 5-2a...5-2c
PR46W15	1181-1/19 in 1181-2/19	8 + 1	6-1a...6-1h in 6-2a
PR46W24	1182-1/19	8	7a...7h
PT200CL	1183-1/19	8	8a...8h
PT211	1184-1/19 in 1184-2/19	8 + 2	9-1a...9-1h in 9-2a...9-2b
PT228CL	1185-1/19 in 1185-2/19	8	10-1a...10-1h
PT234	1186-1/19 in 1186-2/19	8 + 1	12-1a...12-1h in 12-2a
PT240CL	1187-1/19	8	13a...13h
PX104	1188-1/19 in 1188-2/19	8 + 8	14-1a...14-1h in 14-2a...14-2h
PX113	1189-1/19	8	15a...15h
PX125CL	1190-1/19	8	16a...16h
Starška	1191-1/19	8	17a...17h

- Bela gorjušica

Sorta	Analizna številka	Število individualnih rastlin v analizi	Laboratorijska oznaka genotipa
Torpedo	1207-1/19 in 1207-2/19	8 + 8	33-1a...33-1h in 33-2a...33-2h

Izolacijo DNA posameznih vzorcev smo opravili s kitom BioSprint 15 DNA Plant (Qiagen) na robotu za izolacijo nukleinskih kislin MagMax (Applied Biosystems) po objavljenem protokolu (Pipan in Meglič, 2018). Pri genotipizaciji smo uporabili devet markerjev, ki določajo nivo razlikovanja med vrstami in znotraj njih iz družine križnic (Preglednica 25).

Preglednica 25: Seznam markerjev in njihove aplikacije pri navadni in beli gorjušici

Ime markerja (oznaka v laboratoriju)	Tip markerja	Nivo razlikovanja	PCR protokol	Uporabljena kemija v PCR	Dolžinski standard v fragmentni analizi
<i>BN83B1 (ao)</i>	SSR	Razločevanje med <i>B. napus</i> in <i>B. rapa</i> in raznolikost znotraj <i>B. napus</i>	Piquemal	BT	ROX 500
<i>B.n.68/1 (ap)</i>	SSR	Razločevanje med <i>B. napus</i> in <i>B. oleracea</i> in raznolikost znotraj <i>B. napus</i>	Piquemal	QB	ROX 500
<i>Na12-C08 (ar)</i>	SSR	Razločevanje med <i>B. napus</i> od <i>B. rapa</i> ter <i>B. oleracea</i> od <i>S. arvensis</i> in raznolikost znotraj <i>B. napus</i>	Piquemal	BT	ROX 500
<i>Na10-A08 (as)</i>	SSR	ločuje med <i>B. napus</i> in <i>B. rapa</i> ter za raznolikost znotraj <i>B. napus</i>	Piquemal	BT	ROX 500
<i>Na12-G05 (at)</i>	SSR	Raznolikost znotraj <i>B. napus</i>	Piquemal	BT	ROX 500
<i>O111-D12 (au)</i>	SSR	Raznolikost znotraj <i>B. napus</i>	SSR-tail	BT	ROX 500
<i>Ni4-D09 (av)</i>	SSR	Raznolikost znotraj <i>B. napus</i> in njenih kompatibilnih sorodnikov	Piquemal	BT	ROX 500
<i>SCAR7 (az)</i>	SCAR	Razločevanje znotraj <i>B.rapa/B.nigra/B. oleracea</i>	scar7_johns_bt	BT	NA
<i>SCAR1 (ax)</i>	SCAR	Razločevanje znotraj <i>B.rapa/B.nigra/B. oleracea</i>	scar1_johns_bt	BT	NA

Poleg SSR markerjev smo v tej analizi uporabili še dva PCR-specifična SCAR markerja kot je navedeno v Preglednici 25.

7.2 Rezultati analize kakovosti semena

Za vsako analizo številko smo zabeležili število semen, ki smo jih dali na test kalivosti, število normalnih, nenormalnih klic, mrtvih semen in delež normalnih, nenormalnih klic ter mrtvih semen (Preglednici 26 in 27). Semena in klice smo tudi fotografirali

SORTA	Analizna številka	ŠT.SEMEN na test kalivosti	REZULTATI - število klic/semen			REZULTATI - delež klic/semen (%)		
			NORMALNE klice	NENORMALNE klice	MRTVA semena	NORMALNE klice	NENORMALNE klice	MRTVA semena
Daniela	1177- 1/19	100	44	1	5	88	2	10
PR45DO3	1178- 1/19	50	40	1	9	80	2	18
PR45DO3	1178- 2/19	33	15	2	16	45	6	49
PR45DO5	1179- 1/19	50	47	0	3	94	0	6
PR45DO5	1179- 2/19	7	5	0	2	71	0	29
PR46W14	1180- 1/19	50	48	1	1	96	2	2
PR46W14	1180- 2/19	4	3	0	1	75	0	25

PR46W15	1181- 1/19	50	26	0	24	52	0	48
PR46W15	1181- 2/19	6	1	0	5	17	0	83
PR46W24	1182- 1/19	50	47	0	3	94	0	6
PT200CL	1183- 1/19	50	49	0	1	98	0	2
PT211	1184- 1/19	50	50	0	0	100	0	0
PT211	1184- 2/19	2	2	0	0	100	0	0
PT228CL	1185- 1/19	50	48	0	2	96	0	4
PT234	1186- 1/19	50	46	0	4	92	0	8
PT234	1186- 2/19	1	1	0	0	100	0	0
PT240CL	1187- 1/19	50	44	1	5	88	2	10
PX104	1188- 1/19	50	39	1	10	78	2	20
PX104	11882/19	15	14	0	1	93	0	7
PX113	1189- 1/19	50	46	1	3	92	2	6
PX125CL	1190- 1/19	50	50	0	0	100	0	0
Starška	1191- 1/19	50	47	2	1	94	4	2

- Navadna ogrščica

Preglednica 26: Podatki o številu semen, ki smo jih dali na test kalivosti, številu normalnih, nenormalnih klic, mrtvih semen in delež normalnih, nenormalnih klic in mrtvih semen za sorte navadne ogrščice

SORTA	Analizna številka	ŠT.SEMEN na test kalivosti	REZULTATI - število klic/semen			REZULTATI - delež klic/semen (%)		
			NORMALNE klice	NENORMALNE klice	MRTVA semena	NORMALNE klice	NENORMALNE klice	MRTVA semena
Daniela	1177- 1/19	100	44	1	5	88	2	10
PR45DO3	1178- 1/19	50	40	1	9	80	2	18
PR45DO3	1178- 2/19	33	15	2	16	45	6	49
PR45DO5	1179- 1/19	50	47	0	3	94	0	6
PR45DO5	1179- 2/19	7	5	0	2	71	0	29
PR46W14	1180- 1/19	50	48	1	1	96	2	2
PR46W14	1180- 2/19	4	3	0	1	75	0	25
PR46W15	1181- 1/19	50	26	0	24	52	0	48

PR46W15	1181- 2/19	6	1	0	5	17	0	83
PR46W24	1182- 1/19	50	47	0	3	94	0	6
PT200CL	1183- 1/19	50	49	0	1	98	0	2
PT211	1184- 1/19	50	50	0	0	100	0	0
PT211	1184- 2/19	2	2	0	0	100	0	0
PT228CL	1185- 1/19	50	48	0	2	96	0	4
PT234	1186- 1/19	50	46	0	4	92	0	8
PT234	1186- 2/19	1	1	0	0	100	0	0
PT240CL	1187- 1/19	50	44	1	5	88	2	10
PX104	1188- 1/19	50	39	1	10	78	2	20
PX104	11882/19	15	14	0	1	93	0	7
PX113	1189- 1/19	50	46	1	3	92	2	6
PX125CL	1190- 1/19	50	50	0	0	100	0	0
Starška	1191- 1/19	50	47	2	1	94	4	2

1.) Daniela: kalivost semen z analizo številko 1117-1/19 je bila 88 %.



2.) PR45DO3: kalivost semen z analiznima številka 1178-1/19 (1) in 1178-2/19 (2) je bila 80 in 45%.



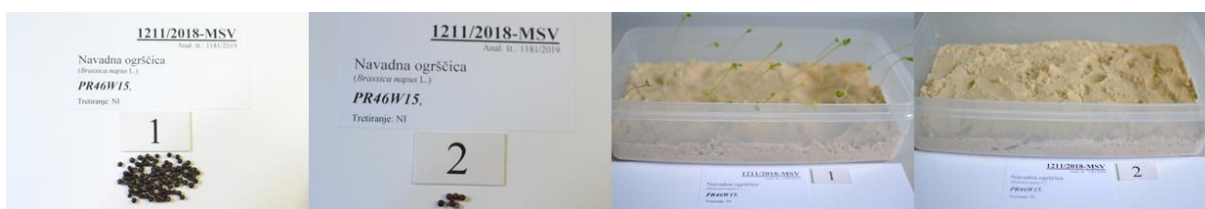
3.) PR45DO5: kalivost semen z analiznima številka 1179-1/19 (1) in 1179-2/19 (2) je bila 94 in 71%.



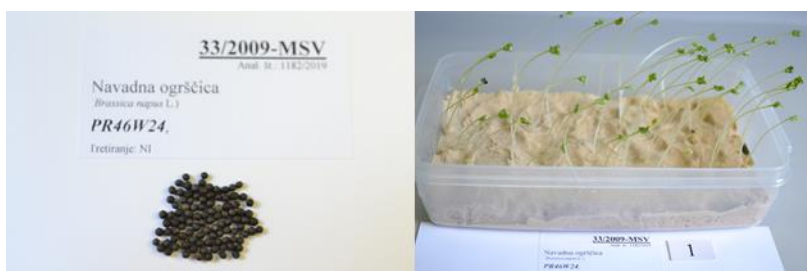
4.) PR46W14: kalivost semen z analiznima številka 1180-1/19 (1) in 1180-2/19 (2) je bila 96 in 75%.



5.) PR46W15: kalivost semen z analiznima številka 1181-1/19 (1) in 1181-2/19 (2) je bila 52 % in 17%.



6.) PR46W24: kalivost semen z analizno številko 1182-1/19 je bila 94 %.



7.) PT200CL: kalivost semen z analizno številko 1183-1/19 je 98 %.



8.) PT211: kalivost semen z analiznima številka 1184-1/19 (1) in 1184-2/19 (2) je bila v obeh primerih 100 %.



9.) PT228CL: kalivost semen z analizno številko 1185-1/19 je bila 98 %.



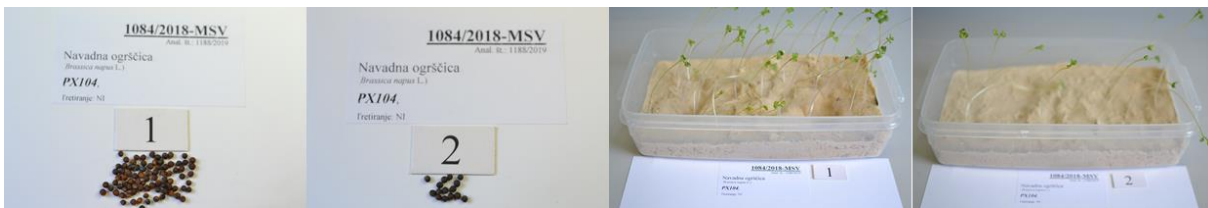
10.) PT234: kalivost semen z analiznima številka 1186-1/19 (1) in 1186-2/19 (2) je bila 92 % in 100%.



11.) PT240CL: kalivost semen z analizno številko 1187-1/19 je bila 88 %.



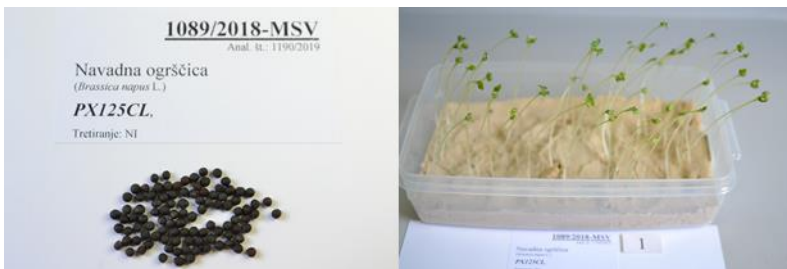
12.) PX104: kalivost semen z analiznima številka 1188-1/19 (1) in 1188-2/19 (2) je bila 78 in 93 %.



13.) PX113: kalivost semen z analizno številko 1189-1/19 je bila 92 %.



14.) PX125CL: kalivost semen z analizno številko 1190-1/19 je bila 100 %.



15.) Starška: kalivost semen z analizno številko 1191-1/19 je bila 94 %.



- Bela gorjušica

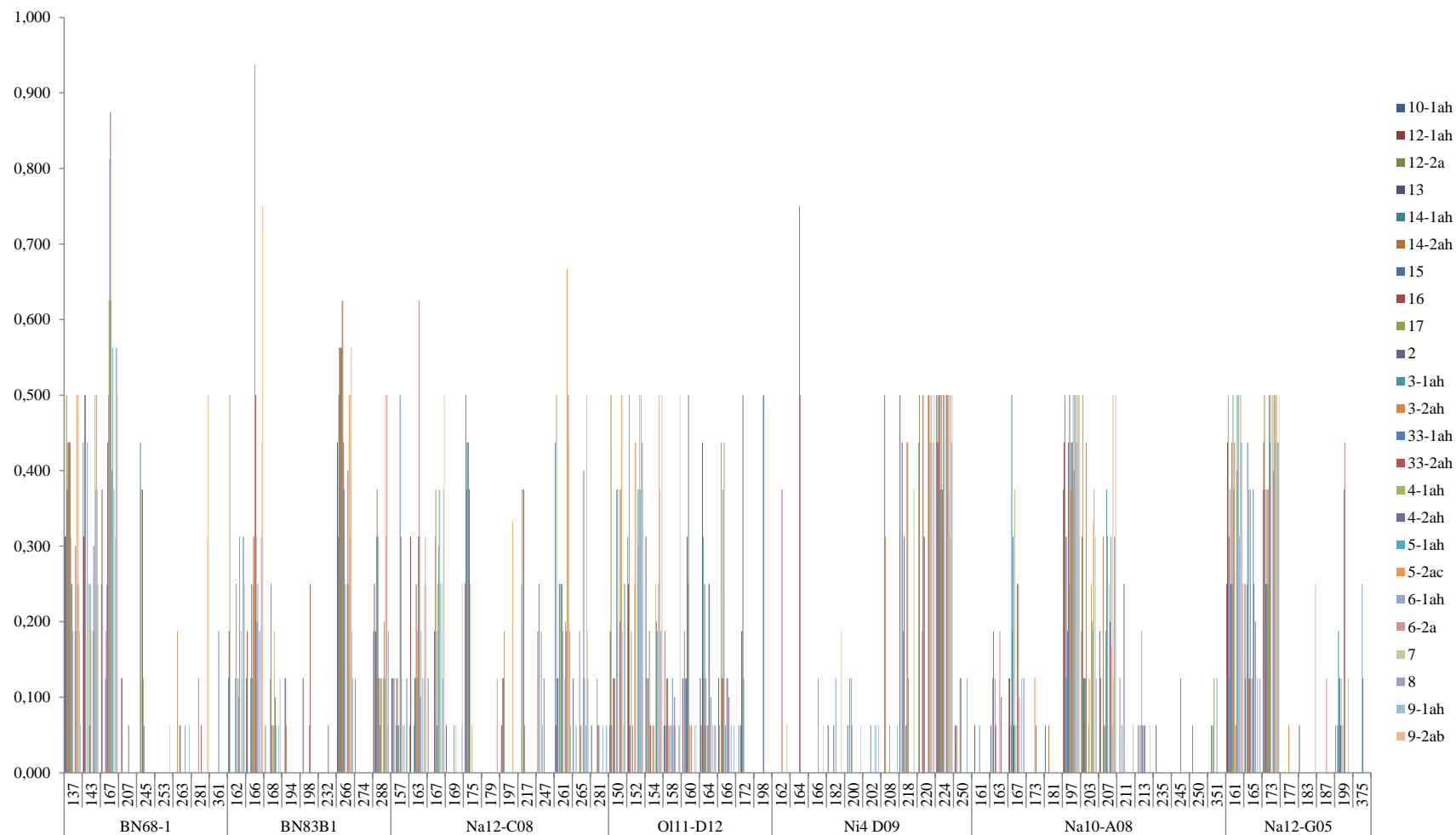
Preglednica 27: Podatki o številu semen, ki smo jih dali na test kalivosti, številu normalnih, nenormalnih klic, mrtvih semen in delež normalnih, nenormalnih klic in mrtvih semen za sorto bele gorjušice

Sorta	Analizna številka	ŠT. SEMEN na test kalivosti	REZULTATI - število klic/semen			REZULTATI - delež klic/semen (%)		
			NORMALNE klice	NENORMALNE klice	MRTVA semena	NORMALNE klice	NENORMALNE klice	MRTVA semena
Torpedo	1207-1/19	50	45	3	2	90	6	4
Torpedo	1207-2/19	12	11	0	1	92	0	8

1.) Torpedo: kalivost semen z analiznima številkama 1207-1/19 (1) in 1207-2/19 (2) je bila 90 % in 92 %.



7.3 Rezultati genetske analize



Slika 14: Frekvenca posameznih alelov glede na vrsto/sorto/podvzorec križnic

Preglednica 28: Ustreznost posameznega markerja za razločevanje med dvema vrstama križnic ter zmožnost ločevanja znotraj njih glede na rezultate Hardy-Weinbergovega ravnotežja

Vrsta/sorta/podvzorec	Lokus/marker	Vsota kvadratov	Verjetnost	Statistična značilnost
0-1ah	BN68-1	12,082	0,007	**
10-1ah	BN83B1	25,469	0,005	**
10-1ah	Na12-C08	25,469	0,227	ns
10-1ah	O111-D12	24,640	0,055	ns
10-1ah	Ni4 D09	8,000	0,005	**
10-1ah	Na10-A08	24,000	0,065	ns
10-1ah	Na12-G05	16,000	0,100	ns
12-1ah	BN68-1	16,000	0,001	**
12-1ah	BN83B1	18,311	0,050	*
12-1ah	Na12-C08	15,147	0,441	ns
12-1ah	O111-D12	35,333	0,026	*
12-1ah	Ni4 D09	8,327	0,215	ns
12-1ah	Na10-A08	16,000	0,014	*
12-1ah	Na12-G05	16,000	0,001	**
12-2a	BN68-1	1,000	0,317	ns
12-2a	BN83B1	1,000	0,317	ns
12-2a	Na12-C08	1,000	0,317	ns
12-2a	O111-D12	1,000	0,317	ns
12-2a	Ni4 D09	1,000	0,317	ns
12-2a	Na10-A08	1,000	0,317	ns
12-2a	Na12-G05	1,000	0,317	ns
13	BN68-1	8,000	0,046	*
13	BN83B1	16,889	0,010	**
13	Na12-C08	24,000	0,008	**
13	O111-D12	28,136	0,136	ns
13	Ni4 D09	8,327	0,215	ns
13	Na10-A08	40,000	0,297	ns
13	Na12-G05	12,000	0,062	ns
14-1ah	BN68-1	16,000	0,001	**
14-1ah	BN83B1	10,469	0,015	*
14-1ah	Na12-C08	14,857	0,137	ns
14-1ah	O111-D12	20,082	0,003	**
14-1ah	Ni4 D09	8,000	0,005	**
14-1ah	Na10-A08	18,000	0,055	ns
14-1ah	Na12-G05	9,796	0,134	ns
14-2ah	BN68-1	10,032	0,018	*
14-2ah	BN83B1	4,840	0,184	ns
14-2ah	Na12-C08	10,032	0,018	*
14-2ah	O111-D12	28,444	0,128	ns
14-2ah	Ni4 D09	8,000	0,046	*
14-2ah	Na10-A08	14,329	0,159	ns
14-2ah	Na12-G05	24,000	0,001	***
15	BN68-1	16,000	0,001	**
15	BN83B1	10,469	0,015	*
15	Na12-C08	24,000	0,008	**
15	O111-D12	23,556	0,073	ns
15	Ni4 D09	8,356	0,213	ns
15	Na10-A08	34,880	0,173	ns
15	Na12-G05	16,889	0,010	**
16	BN68-1	10,032	0,018	*
16	BN83B1	8,320	0,040	*
16	Na12-C08	24,000	0,001	***
16	O111-D12	30,400	0,344	ns
16	Ni4 D09	8,000	0,005	**

Vrsta/sorta/podvzorec	Lokus/marker	Vsota kvadratov	Verjetnost	Statistična značilnost
16	Na12-G05	14,857	0,021	*
17	BN68-1	14,000	0,173	ns
17	BN83B1	16,320	0,012	*
17	Na12-C08	28,000	0,140	ns
17	OI11-D12	11,755	0,068	ns
17	Ni4 D09	15,467	0,116	ns
17	Na10-A08	16,889	0,077	ns
17	Na12-G05	16,889	0,010	**
2	BN68-1	11,755	0,697	ns
2	BN83B1	16,163	0,013	*
2	Na12-C08	24,000	0,065	ns
2	OI11-D12	8,000	0,005	**
2	Ni4 D09	11,200	0,738	ns
2	Na10-A08	8,000	0,238	ns
2	Na12-G05	8,000	0,005	**
3-1ah	BN68-1	16,000	0,001	**
3-1ah	BN83B1	11,769	0,301	ns
3-1ah	Na12-C08	24,720	0,259	ns
3-1ah	OI11-D12	40,000	0,007	**
3-1ah	Ni4 D09	8,000	0,046	*
3-1ah	Na10-A08	24,000	0,008	**
3-1ah	Na12-G05	16,000	0,014	*
3-2ah	BN68-1	16,000	0,001	**
3-2ah	BN83B1	18,000	0,055	ns
3-2ah	Na12-C08	19,556	0,550	ns
3-2ah	OI11-D12	24,000	0,008	**
3-2ah	Ni4 D09	8,000	0,046	*
3-2ah	Na10-A08	17,067	0,073	ns
3-2ah	Na12-G05	8,000	0,046	*
33-1ah	BN68-1	0,426	0,514	ns
33-1ah	BN83B1	0,036	0,850	ns
33-1ah	Na12-C08	8,000	0,046	*
33-1ah	OI11-D12	18,000	0,006	**
33-1ah	Ni4 D09	16,000	0,001	**
33-1ah	Na10-A08	18,163	0,052	ns
33-1ah	Na12-G05	8,000	0,046	*
33-2ah	BN68-1	16,000	0,001	**
33-2ah	BN83B1	12,500	0,253	ns
33-2ah	Na12-C08	2,880	0,410	ns
33-2ah	OI11-D12	16,000	0,100	ns
33-2ah	Ni4 D09	16,000	0,001	**
33-2ah	Na10-A08	16,163	0,095	ns
33-2ah	Na12-G05	11,755	0,302	ns
4-1ah	BN68-1	16,000	0,001	**
4-1ah	BN83B1	18,000	0,055	ns
4-1ah	Na12-C08	25,600	0,042	*
4-1ah	OI11-D12	4,444	0,217	ns
4-1ah	Ni4 D09	8,000	0,005	**
4-1ah	Na10-A08	8,000	0,046	*
4-1ah	Na12-G05	8,000	0,005	**
4-2ah	BN68-1	10,000	0,019	*
4-2ah	BN83B1	11,250	0,338	ns
4-2ah	Na12-C08	6,806	0,339	ns
4-2ah	OI11-D12	18,333	0,246	ns
4-2ah	Ni4 D09	5,000	0,025	*
4-2ah	Na10-A08	15,000	0,132	ns
4-2ah	Na12-G05	10,000	0,019	*

Vrsta/sorta/podvzorec	Lokus/marker	Vsota kvadratov	Verjetnost	Statistična značilnost
5-1ah	BN68-1	11,358	0,078	ns
5-1ah	BN83B1	14,480	0,152	ns
5-1ah	Na12-C08	20,444	0,156	ns
5-1ah	OI11-D12	10,222	0,116	ns
5-1ah	Ni4 D09	8,000	0,046	*
5-1ah	Na10-A08	8,000	0,046	*
5-1ah	Na12-G05	8,000	0,005	**
5-2ac	BN68-1	3,000	0,083	ns
5-2ac	BN83B1	3,000	0,083	ns
5-2ac	Na12-C08	0,750	0,386	ns
5-2ac	OI11-D12	3,000	0,083	ns
5-2ac	Ni4 D09	3,000	0,083	ns
5-2ac	Na10-A08	3,000	0,392	ns
5-2ac	Na12-G05	3,000	0,083	ns
6-1ah	BN68-1	11,556	0,009	**
6-1ah	BN83B1	24,000	0,001	***
6-1ah	Na12-C08	10,500	0,398	ns
6-1ah	OI11-D12	26,000	0,038	*
6-1ah	Ni4 D09	8,762	0,187	ns
6-1ah	Na10-A08	16,000	0,014	*
6-1ah	Na12-G05	16,000	0,014	*
6-2a	BN68-1	1,000	0,317	ns
6-2a	BN83B1	1,000	0,317	ns
6-2a	Na12-C08	1,000	0,317	ns
6-2a	OI11-D12	1,000	0,317	ns
6-2a	Ni4 D09	1,000	0,317	ns
6-2a	Na10-A08	1,000	0,317	ns
6-2a	Na12-G05	1,000	0,317	ns
7	BN68-1	11,876	0,065	ns
7	BN83B1	16,099	0,097	ns
7	Na12-C08	11,469	0,075	ns
7	OI11-D12	24,000	0,008	**
7	Ni4 D09	25,778	0,004	**
7	Na10-A08	8,000	0,238	ns
7	Na12-G05	8,000	0,005	**
8	BN68-1	10,765	0,013	*
8	BN83B1	24,000	0,001	***
8	Na12-C08	32,000	0,059	ns
8	OI11-D12	24,000	0,008	**
8	Ni4 D09	8,000	0,046	*
8	Na10-A08	16,000	0,014	*
8	Na12-G05	16,000	0,001	**
9-1ah	BN68-1	18,469	0,005	**
9-1ah	BN83B1	16,000	0,014	*
9-1ah	Na12-C08	22,756	0,089	ns
9-1ah	OI11-D12	27,556	0,025	*
9-1ah	Ni4 D09	8,327	0,215	ns
9-1ah	Na10-A08	12,500	0,052	ns
9-1ah	Na12-G05	16,000	0,001	**
9-2ab	BN68-1	2,000	0,157	ns
9-2ab	BN83B1	0,222	0,637	ns
9-2ab	Na12-C08	2,000	0,572	ns
9-2ab	OI11-D12	2,000	0,157	ns
9-2ab	Ni4 D09	2,000	0,157	ns
9-2ab	Na10-A08	2,000	0,157	ns
9-2ab	Na12-G05	2,000	0,572	ns

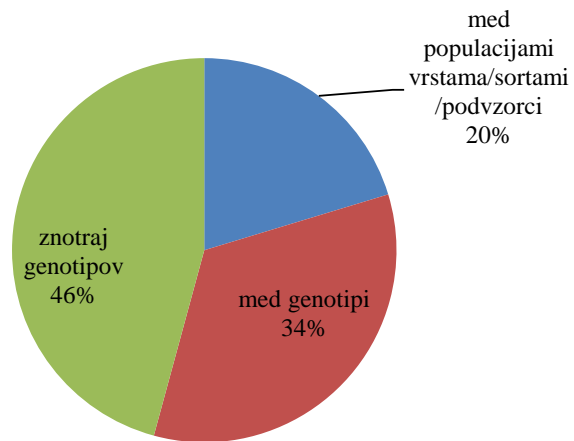
Legenda: ns=ni statistično značilno, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

V Preglednici 28 so z zeleno označeni vrstno in/ali sortno specifični markerji, ki statistično značilno uspešno razločujejo med genomoma navadne ogrščice in bele gorjušice in/ali znotraj njiju. Rezultati kvalitativne analize s SCAR markerjema so pokazali, da sta sortno specifična glede na genom navadne ogrščice, vrstno pa razlikujeta med genomoma navadne ogrščice in bele gorjušice, saj pri beli gorjušici nismo določili prisotnega namnožka.

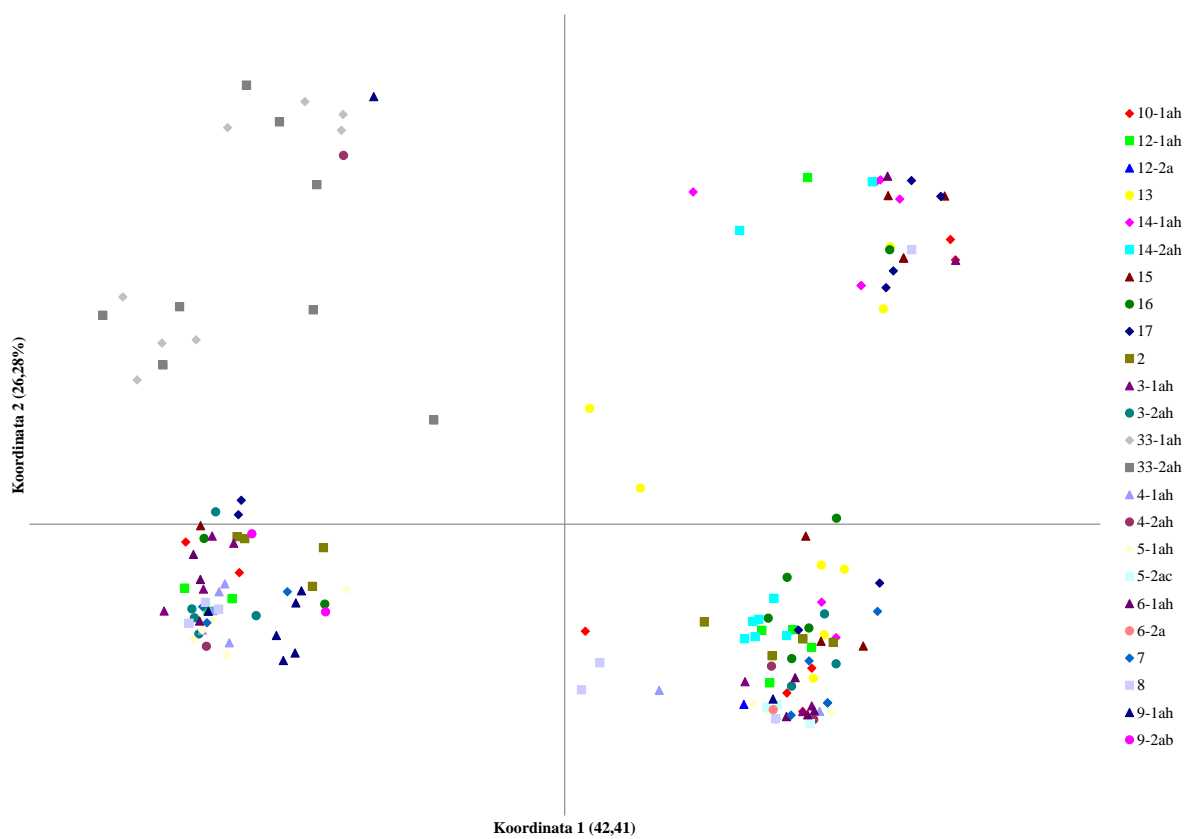
Preglednica 29: Podobnost med vrstama/sortami/podvzorci križnic na podlagi izračuna Nei-jeve gentske razdalje (Nei, 1972)

10-1ah	12-1ah	12-2a	13	14-1ah	14-2ah	15	16	17	2	3-1ah	3-2ah	33-1ah	33-2ah	4-1ah	4-2ah	5-1ah	5-2ac	6-1ah	6-2a	7	8	9-1ah	9-2ab	
1,000																								10-1ah
0,746	1,000																							12-1ah
0,700	0,813	1,000																						12-2a
0,790	0,703	0,660	1,000																					13
0,535	0,519	0,449	0,645	1,000																				14-1ah
0,664	0,678	0,607	0,719	0,827	1,000																			14-2ah
0,784	0,741	0,666	0,872	0,763	0,720	1,000																		15
0,601	0,816	0,719	0,659	0,679	0,794	0,708	1,000																	16
0,695	0,730	0,594	0,717	0,753	0,679	0,892	0,766	1,000																17
0,612	0,729	0,547	0,562	0,379	0,538	0,559	0,728	0,709	1,000															2
0,869	0,782	0,660	0,679	0,425	0,633	0,682	0,619	0,644	0,735	1,000														3-1ah
0,806	0,769	0,663	0,586	0,347	0,587	0,567	0,577	0,534	0,695	0,951	1,000													3-2ah
0,313	0,357	0,062	0,187	0,190	0,128	0,284	0,267	0,353	0,333	0,425	0,398	1,000												33-1ah
0,300	0,409	0,098	0,196	0,208	0,137	0,281	0,279	0,368	0,377	0,410	0,412	0,876	1,000											33-2ah
0,717	0,891	0,723	0,500	0,315	0,541	0,533	0,703	0,579	0,756	0,845	0,872	0,403	0,444	1,000										4-1ah
0,807	0,875	0,753	0,626	0,498	0,618	0,689	0,733	0,701	0,741	0,826	0,801	0,330	0,348	0,913	1,000									4-2ah
0,736	0,871	0,758	0,505	0,325	0,560	0,530	0,674	0,568	0,742	0,873	0,899	0,362	0,396	0,974	0,918	1,000								5-1ah
0,744	0,784	0,864	0,646	0,445	0,634	0,660	0,658	0,595	0,588	0,700	0,658	0,063	0,079	0,736	0,790	0,750	1,000							5-2ac
0,833	0,875	0,819	0,620	0,454	0,574	0,685	0,700	0,681	0,691	0,794	0,783	0,335	0,359	0,877	0,907	0,888	0,859	1,000						6-1ah
0,781	0,731	0,714	0,614	0,417	0,640	0,620	0,594	0,582	0,623	0,672	0,621	0,062	0,078	0,723	0,843	0,737	0,840	0,807	1,000					6-2a
0,901	0,764	0,743	0,703	0,391	0,614	0,643	0,630	0,599	0,702	0,850	0,843	0,279	0,291	0,795	0,821	0,808	0,753	0,852	0,785	1,000				7
0,766	0,900	0,737	0,531	0,373	0,561	0,582	0,668	0,617	0,714	0,852	0,869	0,423	0,459	0,954	0,912	0,964	0,743	0,893	0,759	0,783	1,000			8
0,629	0,793	0,591	0,399	0,303	0,480	0,453	0,599	0,545	0,721	0,800	0,836	0,488	0,516	0,914	0,815	0,921	0,564	0,766	0,581	0,682	0,912	1,000		9-1ah
0,497	0,627	0,364	0,272	0,181	0,360	0,298	0,472	0,363	0,590	0,633	0,643	0,453	0,422	0,731	0,658	0,740	0,354	0,588	0,473	0,524	0,723	0,848	1,000	9-2ab

S sivo označene celice v Preglednici 29 pomenijo visoko stopnjo genetske podobnosti (>0,83) med vrstama/sortami/podvzorci navadne ogršičice in bele gorjušice.



Slika 15: Delež molekulske variabilnosti na podlagi R-statistike



Slika 16: Razporeditev genotipov iz družine križnic na podlagi rezultatov analize glavnih koordinat (PCoA)

