

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

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

Barbara PIPAN¹ (✉), Lovro SINKOVIČ¹, Romana RUTAR², Vladimir MEGLIČ¹

¹ Crop Science Department, Agricultural Institute of Slovenia, Hacquetova ulica 17, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

² Service for Official Certification, Agricultural Institute of Slovenia, Hacquetova ulica 17, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

✉ Corresponding author: barbara.pipan@kis.si

Received: December 1, 2020; accepted: March 16, 2021

ABSTRACT

The usefulness of genetic identification of varieties for seed quality analyses becomes important, when we suspect the presence of another variety, species or even genus, based on morphological seed traits in the purity analysis and germination test. With genetic analyses, the doubt about the authenticity of the naked oats (*Avena nuda* L.) variety 'Kamil' was successfully solved. There were atypical seeds with chaff among the samples of this variety, so it was not possible to confirm with certainty, whether these were seeds of the same species/variety or impurities of common oats (*Avena sativa* L.). Based on the seed phenotype of the 'Kamil' variety (two independent samples 284 and 285), four sub-samples were prepared (284AN, 284AS, 285AN, 285AS); AN label was the sub-sample with naked seeds and AS label was the sub-sample with chaffed seeds. In addition, another variety ('Noni') and four accessions of common oats (ACC378, ACC379, ACC380, ACC381) from the Slovene Plant Gene Bank were included as common oat standards. A total of 36 plant samples of *Avena* sp. were included in the genetic differentiation. Using a set of six highly informative SSR markers and the results of diversity parameters at individual loci and paired genetic comparisons, we were able to confirm that the analysed sub-samples belonged to the same variety, i.e. 'Kamil'. In addition, despite the morphological similarity, the chaffed seeds of naked oats variety 'Kamil' were sufficiently (genetically) different from the analysed variety and/or accessions of common oats.

Keywords: genetic identification, SSR markers, oat, varietal authenticity

IZVLEČEK

Uporabnost genetske identifikacije sort se kaže pri analizah kakovosti semena, ko se na osnovi morfoloških znakov semena pri analizi čistote in/ali klic v postopku kalivosti pojavi sum na drugo sorto, vrsto ali celo rod. Z aplikativno uporabo genetskih analiz smo uspešno rešili dvom o pristnosti sorte 'Kamil' vrste golega ovsa (*Avena nuda* L.). Med semenom omenjene sorte je bilo namreč prisotno tudi seme s plevo, a se ni dalo z gotovostjo potrditi ali gre za seme iste vrste s plevo ali za primes semen navadnega ovsa (*Avena sativa* L.). Na podlagi fenotipa semena sorte 'Kamil' (dva neodvisna vzorca 284 in 285) so bili pripravljene štiri pod-vzorci (284AN, 284AS, 285AN, 285AS), kjer AN pomeni golce, AS pa plevence. Kot standardi navadnega ovsa so bili v genetsko identifikacijo vključene še sorta navadnega ovsa 'Noni' in štiri akcesije navadnega ovsa (ACC378, ACC379, ACC380, ACC381) iz Slovenske rastlinske genske banke. Skupno je bilo v genotipizacijo vključenih 36 vzorcev rastlin rodu *Avena* sp. Z uporabo seta šestih visoko informativnih SSR markerjev in rezultatov analize parametrov raznolikosti na posameznih lokusih ter parnih genetskih primerjav smo lahko potrdili, da so analizirani pod-vzorci pripadali isti vrsti in sorti, t.j. golemu ovsu 'Kamil'. Poleg tega so bili kljub morfološki podobnosti plevenci sorte 'Kamil' genetsko dovolj različni od analizirane sorte in/ali akcesij navadnega ovsa.

Ključne besede: genetska identifikacija, SSR markerji, oves, vrstna pristnost

DETAILED ABSTRACT

Varietal authenticity and seed quality of varieties that are adapted to Slovenian production conditions are of key importance for successful agricultural production and consequently for ensuring food security and reducing the risk in agricultural production. In practice, when confirming seed crops during growing season, the problem of identifying varieties of atypical plants, especially within plant species of cereals and crosses, arises. The usefulness of genetic identification of varieties is shown in seed quality analyses, when on the basis of morphological traits of seeds in the purity analysis and germination test there is a suspicion of another variety, species or even genus. With the application of genetic analyses the doubt regarding the authenticity of the variety 'Kamil' of naked oats (*Avena nuda* L.) was successfully solved. Among the seeds of variety 'Kamil' there was a presence of seeds with chaff, so it was not possible to confirm with certainty whether these were seeds of the same species with chaff or impurities of seeds of common oats. Based on the verification of varietal purity and morphology of oat seeds, four sub-samples (284AS, 284AN, 285AS, 285AN) of the *A. nuda* variety 'Kamil' were prepared. In addition variety of the *A. sativa* ('Noni') and four accessions of common oats (ACC378, ACC379, ACC380, ACC381) from Slovene Plant Gene Bank were included. Each sample was represented by four individual plants (a, b, c, d) to ensure diversity within each variety/accession. A total of 36 genotypes/individual plants of *Avena* sp. were included in the genetic identification. DNA isolation from young plant leaves was performed on a nucleic acid isolation robot using isolation kit. The original DNA was used for genetic analysis for PCR using six specific SSR markers presented in Table 1. The results were read by GeneMapper4.0 and prepared for codominant matrices for further processing. Based on the obtained results, a detailed computer analysis was required at both, the 2n and 6n levels. Several statistical programs and software packages were used to visualize the quantitative results presented in Tables 2&3 and Figs 1–4. The overall polymorphic information content of six SSR markers was 0.710. There was also small deviation (0.126) between total expected (0.752) and observed heterozygosity (0.878). According to the principal coordinate analysis and analysis of the genetic structure, two groups of genotypes were formulated. Pairwise comparisons of Nei's genetic distance showed that genetic relatedness of AN and AS sub-samples within variety 'Kamil' was higher (>0.8) compared to the common oat variety/accessions (>0.7). Despite the high degree of genetic similarity among the studied 36 *Avena* sp. genotypes, based on statistical analysis and relevant genetic diversity parameters at the codominant 6n level, we were able to confirm that the analysed sub-samples belonged to the same species and variety, i.e. 'Kamil'.

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 ter zmanjšanje tveganja v kmetijski pridelavi. Pravila mednarodne zveze za testiranje semena ISTA (angl. *International Seed Testing Association*) so s 1. 1. 2017 predpisala bolj zanesljive postopke določitve sortne pristnosti, ki temeljijo na uporabi DNA markerjev (International Rules for Seed Testing, 2020). Dejansko se tudi v praksi pri potrjevanju semenskih posevkov tekom vegetacije pojavlja problem identifikacije sort netipičnih rastlin, predvsem znotraj rastlinskih vrst žit in križnic. Uporabnost genetske identifikacije sort s pomočjo

genetskih analiz z molekulskimi markerji se kaže pri analizah kakovosti semena v laboratoriju, ko se na osnovi morfoloških znakov semena pri analizi čistote in/ali klic v postopku kalivosti pojavi sum na drugo sorto, vrsto ali celo rod. Nove sorte so si med seboj namreč vedno bolj morfološko podobne, zato je njihova identifikacija na osnovi vidnih znakov vedno težja.

V sklopu Službe za uradno potrjevanje semenskega in sadilnega materiala kmetijskih rastlin deluje na Kmetijskem inštitutu Slovenije edini mednarodni laboratorij za kontrolo kakovosti semena v Sloveniji. Laboratorij je že 64 let član mednarodne zveze za testiranje semena ISTA, že skoraj 20 let pa je akreditiran v sklopu ISTA in ima s strani Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano (MKGP) Republike Slovenije (RS) pooblastilo za izvajanje

analiz kakovosti semena (Simončič in Žilič, 2018), ki se morajo izvajati po predpisih ISTA (International Rules for Seed Testing, 2020).

Čistota semena je razmerje med količino semena tiste vrste, ki jo analiziramo, ter količinami semena drugih vrst rastlin in mrtvih primesi skupaj. Analizo opravimo na delovnem vzorcu, ki ga predstavlja najmanj 2.500 semen. V izjemnih primerih, ko je na razpolago zelo majhna količina partije ali ko gre za izredno drago seme, lahko analizo izvedemo na manjšem delovnem vzorcu. Vzorec praviloma ločimo na tri glavne komponente: čisto ali osnovno seme, seme drugih vrst rastlin in mrtve primesi. Delež komponent izrazimo v utežnih % na eno decimalno mesto (International Rules for Seed Testing, 2020).

Sortno ali vrstno pristnost določamo v laboratoriju na podlagi primerjave testnih vzorcev z referenčnimi standardnimi vzorci, ki temeljijo na specifičnih DNA markerjih ali označevalcih za posamezne vrste, sorte ali hibride. Za preverjanje sortne čistosti in pristnosti ter za identifikacijo sort najpogosteje uporabljamo SSR markerje (ang. Simple Sequence Repeats; slov. enostavna ponovljiva zaporedja), ki so izbrani na podlagi razlik v primarni strukturi DNA (International Rules for Seed Testing, 2020). Li in sod. (2000) v svoji študiji opisujejo genetsko razločevanje znotraj *Avena* vrst z uporabo SSR markerjev, kar je bila glede na namen, osnova tudi za našo študijo. Sicer so SSR markerji širše uporabljeni v aplikativnih genetskih študijah za razločevanje znotraj sort in med njimi tudi pri drugih rastlinskih vrstah (Pipan in sod., 2013; 2017; Rusjan in sod., 2012). V našem laboratoriju smo zato začeli z uvedbo molekularnih markerjev v primeru pojava dvomov na nivoju fenotipsko izraženih znakov ter v raziskovalne namene in za namene žlahtnjenja z uporabo molekularnih markerjev.

Goli oves (*Avena nuda* L., genom AACCCDD, $2n = 21$, $x = 7$) je eden izmed najpomembnejših predstavnikov žit za prehrano ljudi, ki vsebuje velike količine beljakovin in beta-glukanov (Song in sod., 2015), medtem ko je navadni oves (*Avena sativa* L., $2n=6x=42$, genom AACCCDD) eden izmed šestih najbolj razširjenih žit v pridelavi na svetu. Navadni in goli oves sta se razvila iz samoraslega ovsa v

jugovzhodni Aziji (Loskutov, 2008). Obe rastlinski vrsti razvijeta seme, ki je do žetve oblečeno v plevo, pri sami žetvi pa seme golega ovsa enostavno pade iz nje, medtem ko je seme navadnega ovsa tudi po tem postopku še vedno oblečeno v plevo. V prispevku predstavljamo izsledke aplikativne raziskave, v kateri smo s pomočjo genetskih analiz uspešno rešili dvom, ki se je pojavil pri uradnem potrjevanju semenskih posevkov oz. partij semena v praksi. V laboratorij smo v preverjanje sortne čistosti prejeli vzorec semena golega ovsa sorte 'Kamil'. ISTA namreč predpisuje le metodološke postopke in ne normativov za določanje čistote semena ter ostalih lastnosti. Normativi so urejeni nacionalno, torej za Slovenijo veljajo EU direktive in normativi, ki za goli oves narekujejo 75 % kalivost in za certificirano seme prve množitve 98 % čistoto ter dovoljujejo 2 % ostalih primesi, ki vključujejo tudi primesi drugih vrst, kjer so primesi žit dovoljene le do 7 semen v 500 g vzorca. V prinesenem vzorcu je bilo prisotno seme s plevo, zato analitiki nismo mogli z gotovostjo potrditi, ali gre za primesi semena navadnega ovsa ali pa celo za »oblečeno seme« golega ovsa. Glede na omenjeno težavo smo na podlagi genetskih raziskav želeli ugotoviti, ali gre dejansko za dve različni vrsti ovsa, ali vendarle le za eno, za katero pleva po žetvi sicer ni značilna, lahko pa bi bila njena prisotnost posledica žetve še nedozorelega pridelka.

MATERIAL IN METODE DELA

Na podlagi analize fenotipsko izraženih znakov semena golega ovsa sorte 'Kamil' (vzorca 284 in 285) smo v skladu s predpisano ISTA metodologijo za goli oves (International Rules for Seed Testing, 2020) pripravili štiri pod-vzorke, in sicer 284AS (4 rastline plevencev), 284AN (4 rastline golcev), 285AS (4 rastline plevencev) in 285AN (4 rastline golcev). Oznaka AN pomeni seme ovsa vrste *Avena nuda* L., AS pa, da smo v laboratoriju na podlagi morfologije semena predvidevali, da gre za primesi semena vrste *Avena sativa* L.

Rezultat analize čistote semena pri vzorcu 284 je znašal 99,9 % in je vključeval štiri semena v plevi; pri vzorcu št. 285 je bila čistota 99,8 % z dvanajstimi semeni v plevi. Dodatno smo v genetsko analizo vključili še

slovensko sorto navadnega ovsa (*Avena sativa* L.) im. 'Noni', ki je vpisana v Slovensko sortno listo (Sortna lista, 2020) in v skupni EU katalog sort poljščin, ter štiri akcesije navadnega ovsa (ACC378, ACC379, ACC380, ACC381), ki so shranjene v Slovenski rastlinski genski banki (SRGB) na Kmetijskem inštitutu Slovenije. Vsak vzorec je bil zaradi zagotavljanja raznolikosti znotraj posamezne sorte/akcesije zastopan s štirimi individualnimi rastlinami (a, b, c, d). Skupno je bilo v genotipizacijo vključenih 36 genotipov/individualnih rastlin rodu *Avena* sp.

Glede na to, da se je dvom pojavil pri dveh morfološko zelo podobnih in genetsko visoko sorodnih vrstah, smo v genetsko analizo vključili specifične molekulske markerje SSR, ki so se na podlagi objav izkazali kot polimorfni za ločevanje vrst, sort in kultivarjev znotraj rodu *Avena*. Uporabili smo set šestih SSR markerjev (preglednica 1), ki so se v študiji Li in sod. (2000) izkazali kot visoko informativni.

Vsak vzorec ovsa s posamezno analizo oznako je bil v genotipizaciji zastopan s štirimi posameznimi rastlinami (a, b, c, d), s čimer smo lahko zajeli tudi raznolikost znotraj posamezne sorte ali akcesije. Izolacijo DNA iz listov mladih rastlin smo izvedli na robotu za izolacijo nukleinskih kislin (MagMax, Applied Biosystems), uporabili smo kemikalije iz kompleta za izolacijo DNA

BioSprint 15 DNA Plant (Qiagen). Kvalitativno prisotnost DNA v posameznem izolatu smo preverili na 2% agarozni horizontalni elektroforezi. 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). Originalno DNA smo nato 8× redčili in jo uporabili za nadaljnjo analizo v PCR s šestimi specifičnimi SSR markerji. Vsakemu paru začetnih oligonukleotidov (»F-forward« del) smo prilepili fluorescentno M13 značko (Schuleke, 2000), ki omogoča natančno fluorescentno detekcijo alelov v fragmentni analizi (preglednica 1).

Amplifikacija je potekala v skupnem volumnu 11 µl, od česar je bilo 1 µl izvorne DNA, z Biotools kemijo po optimiziranem PCR programu (Pipan in Meglič, 2019) na cikličnem termostatu Veriti (Applied Biosystems). Uspešnost amplifikacije smo kvalitativno preverili na 1,4 % agarozni horizontalni elektroforezi (Syngene). Za natančnejšo detekcijo alelnih dolžin smo uporabili »QIAXcel advanced system« kapilarne elektroforeze visoke ločljivosti po OM500 metodi ter z uporabo 15–600 baznih parov (bp) poravnalnega standarda in 25–500 bp dolžinskega standarda. Po končani analizi in branju rezultatov nismo pridobili dovolj natančnih

Table 1. A set of SSR markers used for oat genotyping

Tablica 1. Uporabljeni set SSR markerjev za genotipizacijo ovsa

Marker	F sequence	R sequence	Repeat motif	Expected length	M13 label
Marker	F zaporedje	R zaporedje	Ponavljajoči motiv	Pričakovana dolžina	M13 oznaka
AM1	5'GGA TCC TCC ACG CTG TTG A	5'CTC ATC CGT ATG GGC TTT A	(AG)21(CAGAG)6	204 bp	FAM
AM3	5'CTG GTC ATC CTC GCC GTT CA	5'CAT TTA GCC AGG TTG CCA GGT C	(AG)35	280 bp	NED
AM4	5'GGT AAG GTT TCG AAG AGC AAA G	5'GGG CTA TAT CCA TCC CTC AC	(AG)34	166 bp	HEX
AM11	5'TCG TGG CAG AGA ATC AAA GAC AC	5'TGG GTG GAG GCA AAA ACA AAA C	(AG)12(AAAG)3	225 bp	FAM
AM14	5'GTG GTG GGC ACG GTA TCA	5'TGG GTG GCG AAG CGA ATC	(AC)21	133 bp	NED
AM30	5'TGA AGA TAG CCA TGA GGA AC	5'GTG CAA ATT GAG TTT CAC G	(GAA)14	203 bp	HEX

bp, base pair

bp, bazni par

odčitkov, zato smo dodatno fragmentno analizo opravili na genetskem analizatorju ABI3130XL. Fragmentno reakcijo smo pripravili s 7 μ l formamida in 0.4 μ l ROX-500 internega dolžinskega standarda v vsakem vzorcu skupaj z združenimi post-PCR produkti glede na različno M13 fluorescentno oznako, kot je opisano v Pipan in Meglič (2019).

Rezultate smo prebrali v programu GeneMapper4.0 (Applied Biosystems) in jih za nadaljnjo obdelavo pripravili v kodominantne matrike. Glede na pridobljene rezultate je bila potrebna podrobna računalniška analiza tako na 2n kot na 6n nivoju, saj je *Avena nuda* L. praviloma diploidna rastlinska vrsta, *Avena sativa* L. pa heksaploidna. Za vizualizacijo kvantitativnih rezultatov smo uporabili sledeče statistične programe in programske pakete: MsToolkit (Park, 2001) (izračun obravnavane in pričakovane heterozigotnosti ter informacijske vrednosti polimorfizma na osnovi vseh 36-ih genotipov na posameznem lokusu), GenAEx (Peakall in Smouse, 2006) (izračun povprečnega števila migrantov na posameznem lokusu; analiza glavnih koordinat; Nei-jeva (Nei, 1972) analiza parnih primerjav na osnovi genetske enakosti; primerjava alelnih profilov; izračun Hardy-Weinbergovega ravnotežja; analiza molekulske variabilnosti), Populations (Langella, 2002) (izračun genetskih razdalje Nei-jevi standardni metodi (Nei, 1972) in UPGMA metodi združevanja ter 1000 ponovitev kalkulacij), Treview (Page, 1996) (vizualizacija dendrograma), Structure (Pritchard in sod., 2009) (20 neodvisnih ponovitev za vsak K (od 1 do 15) za mešani model z začetnimi 10000 iteracijami in 100000 Markov chain Monte Carlo ponovitvami; analiza genetske strukture) in Structure Harvester (Earl in Holdt, 2011) (določitev števila genetskih skupin).

REZULTATI IN DISKUSIJA

Rezultati študije temeljijo na obravnavi z orodji populacijske genetike, ki tokrat niso za namene evalvacije raznolikosti, ampak imajo aplikativno vlogo. Analiza alelnih profilov in informativnost markerjev, analiza glavnih koordinat, metode združevanja na osnovi genetske razdalje in analiza genetske strukture - vse to so rezultati, ki smo jih z uporabo različnih algoritmov,

implementiranih v programe populacijske genetike, izračunali in pridobili. Le-ti v svojem direktnem smislu podajajo osnovno informacijo o genetskih relacijah na različnih nivojih, posredno pa s poznavanjem ozadja posamezne analize (torej algoritma) lahko interpretiramo in podamo uporabne zaključke na primeru dejanskega ločevanja dveh vrst ovs. Zato je bilo potrebno izvesti obsežno analizo populacijske genetike na 2n in 6n nivoju, da smo lahko s kombinacijo bistvenih rezultatov (iz celotne analize smo v študiji prikazali le ok. 3 % relevantnih za naš namen) podali zaključke, ki so dejansko pomagali k rešitvi problema/dvoma o pristnosti sorte Kamil.

Informativnost in polimorfnost SSR markerjev

Skupno je bilo analiziranih 36 genotipov/rastlin ovs (*Avena* sp.), ki vključujejo šest različnih vrst/sort/akcesij. Analiza rezultatov je pokazala, da lokus AM3 zaznava le diploidni nivo genomov, lokus AM30 pa heksaploidnega. Ker smo genotipizacijo izvedli na sekvenatorju (določanje dolžine alelov je bilo na eno bazo natančno), smo lahko pripravili 2n, 4n in 6n matriko alelnih dolžin, glede na to koliko alelov smo pri posameznem genotipu na posameznem lokusu lahko zaznali. Na nobenem od lokusov ni bilo jasne razločitve, na podlagi katere bi lahko zaključili ali gre za 2n ali 6n naravo genotipov. Temu stanju se še najbolj približa lokus AM11, kjer smo v genotipizaciji lahko določili vseh 6 alelov, saj smo na tem lokusu detektirali tudi največje št. migrantov (3,704, preglednica 2). Tako smo lahko že takoj sklepali, da izbrani set markerjev v osnovi ni namenjen razločevanju vrst *Avena nuda* L. in *Avena sativa* L., uspešno pa zazna polimorfizme na podlagi alelne raznolikosti med njima.

Nekateri AM markerji so bili uporabljeni tudi pri konstrukciji 6n genetske mape golega ovs (Song in sod., 2015). Na podlagi pregleda dostopne literature se je izkazalo, da do sedaj še ni bilo razvitih SSR markerjev, ki bi omenjeni vrsti med seboj kvalitativno ločili. Izmed 44 SSR markerjev so Li in sod. (2000) v svoji študiji identificirali 62% markerjev, ki so se uspešno namnožili pri *Avena sativa* ter ostalih *Avena* sp. genomih hkrati. Iz pridobljenih rezultatov sklepamo, da sta si na nivoju analiziranih lokusov obe vrsti ovs zelo podobni. Na to kažejo tudi

sinonimi, ki sicer različno vrsto, t.j. goli oves, še vedno imenujejo kot podvrsto (*Avena sativa* subsp. *nuda* L. Gillet & Magne) ali varieteto navadnega ovsa (*Avena sativa* var. *nuda* L. Körn). Z uporabo najnovejših metod na podlagi sekvenciranja naslednje generacije (NGS, GWAS) pa že poročajo o identifikaciji štirih genov, ki so povezani z odsotnostjo pleve pri navadnem ovsu (Yan in sod. 2020).

Na podlagi rezultatov genotipizacije, ki so predstavljeni v preglednici 2, lahko razberemo, da je izbrani set SSR markerjev visoko informativen za ločevanje akcesij in sort znotraj rodu *Avena* sp. Največji delež polimorfizmov (0,842) smo zaznali na lokusu AM4, kjer je bila tudi raznolikost med obravnavanimi rastlinami ovsa največja. Na lokusih AM11 in AM14 je pri vzorcu 285AS prišlo do statistično značilnih odstopanj ($P < 0.05$) od Hardy-Weinbergovega ravnotežja, podobno pa se je pokazalo tudi na lokusu AM11 pri vzorcu 284AN. To pomeni, da so vsi obravnavni vzorci, z izjemo vzorcev 284AS, 285AS in 285AN, visoko uniformni ter homogeni. Kljub visoki stopnji podobnosti se pri vzorcih 284AS (a, b, c, d) in 285AS (a, b, c, d) kažejo statistično značilne spremembe v alelni strukturi med analiziranimi genotipi na podlagi Hardy-Weinbergovega ravnotežja ter odstopanja med obravnavano in pričakovano heterozigotnostjo v preglednici 2, kar bi lahko bila posledica tega, da gre v obeh primerih za goli oves. Lokusa AM11 in AM14 torej

na podlagi rezultatov analize Hardy-Weinbergovega ravnotežja ter parametrov v preglednici 2 lahko uporabimo za razlikovanje med vrstama ovsa, t.j. *Avena sativa* L. in *Avena nuda* L. na podlagi alelnih profilov. V naši študiji je bila povprečna izračunana vrednost 0,71, kar odraža realno in hkrati primerljivo vrednost z ostalimi študijami vrst ovsa (Li in sod. 2000 poročajo o povprečni vrednosti 0,75; izračunana le za markerje, ki smo jih uporabili tudi v naši raziskavi).

Genetska raznolikost obravnavanih rastlin ovsa

Analiza molekulske variabilnosti (AMOVA) je pokazala 23 % raznolikost med ter 4 % znotraj vrst/sort/akcesij; alelna raznolikost med vrstami/sortami/akcesijami pa dosega 9 % in je bila izračunana na podlagi alelne distančne matrike v analizi R-statistike. Iz naštetih rezultatov AMOVA je razvidno, da imamo v analizi opravka s samoprašno rastlinsko vrsto (nizka stopnja molekulske variabilnosti znotraj vrst/sort/akcesij ter hkrati z različnimi sortami in/ali vrstami, ki dosegajo 23 % variabilnost). Najpomembnejši parameter genetske raznolikosti je genetska enakost po Nei (1972), kjer gre za analizo parnih primerjav genotipov (preglednica 3). Vrednosti v preglednici se gibljejo med 0 in 1. Višje kot so, višja je genetska podobnost med vzorci/podvzorci/sortami/akcesijami.

Table 2. Genetic variability parameters by loci

Tablica 2. Parametri genetske variabilnosti po lokusih

Lokus	Expected heterozygosity	Observed heterozygosity	Polymorphic information content	Average no. migrants
Lokus	Pričakovana heterozigotnost	Obravnavana heterozigotnost	Informacijska vrednost polimorfizma	Povprečno št. migrantov
AM1	0.777	0.972	0.746	1.177
AM3	0.674	0.720	0.644	0.792
AM4	0.866	0.941	0.842	1.288
AM11	0.656	0.914	0.589	3.704
AM14	0.808	0.750	0.770	0.565
AM30	0.732	0.972	0.670	2.021
Average				
Povprečje	0.752	0.878	0.710	1.591

Sivo obarvane celice v preglednici 3 jasno kažejo na več kot 80 % stopnjo ujemanja, razen med vzorci 285AS in 285AN, kjer je stopnja ujemanja 76.3 %. Iz poudarjenih parnih primerjav lahko sklepamo, da gre za visoko stopnjo ujemanja med komponentami iste sorte golega ovsa (tj. 'Kamil'), četudi je seme fenotipsko različno. Hkrati pa so te komponente na podlagi nizkih deležev ujemanja dovolj različne od sorte 'Noni' in akcesij iz SRGB, ki pripadajo vrsti navadnega ovsa. V primeru, da primerjamo akcesije navadnega ovsa iz SRGB (ACC378, ACC379, ACC380, ACC381) in sorto 'Noni', lahko pri vseh parih, razen pri ACC379, ACC380 in 'Noni', zaznamo precej nižje deleže ujemanja glede na genetsko identiteto. Pri tej študiji je pomembno poudariti, da smo dva vzorca že registrirane sorte golega ovsa razčlenili na dva pod-vzorca na podlagi golcev in plevencev, pri čemer smo opazovali raznolikost znotraj iste sorte, kar je drugače kot pri raznolikosti med sorami oz. med vrstami. Z uporabo seta izbranih šestih markerjev lahko na podlagi analize alelnih profilov med sabo ločimo tako vrsti golega in navadnega ovsa kot tudi sorte/akcesije.

Analizo glavnih koordinat (PCoA) smo pripravili na podlagi kovariančne matrike genetskih razdalj. Na sliki 1 je razvidno, da se vzorci združujejo v dve skupini, kar je verjetno povezano z genetskim izvorom genomov A in C, ki določata tetraploidno naravo ovsa ($2n=4x=28$, genoma AACC) (Yan in sod., 2020).

Zato se tudi vzorci 284AS, 284AN, 285AS in 285AN pojavljajo v obeh skupinah, so v vsaki skupini enakomerno zastopani in se znotraj skupine nahajajo skupaj. Takšna razporeditev nakazuje na skupni izvor navadnega in golega ovsa, kjer sta vključeni komponenti obeh genomov. Pojasnimo lahko, da je razporeditev genotipov v PCoA na sliki 1 pomemben rezultat, ki nakazuje, da je dejansko stopnja podobnosti med *A. nuda* in *A. sativa* zelo visoka prav zaradi skupnega izvora in da ju je tudi z uporabo genetskih orodij težko ločiti.

Analiza genetske strukture, ki smo jo opravili s pomočjo Bayesove analize (razvrščanje v genetske skupine; Structure in Structure Harvester analiza), je pokazala podobne rezultate kot prej opisana analiza glavnih koordinat (PCoA).

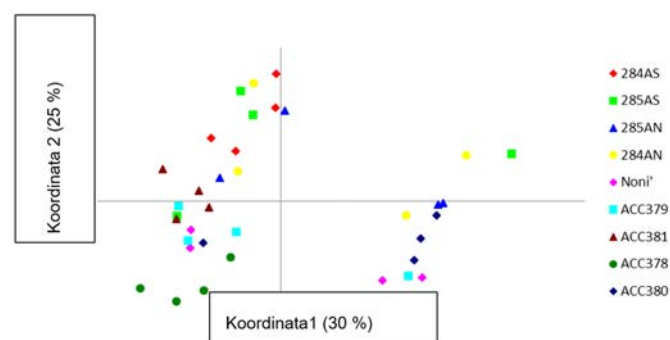


Figure 1. Distribution of oat samples in Principal Coordinate Analysis (PCoA)

Slika 1. Razporeditev vzorcev ovsa pri analizi glavnih koordinat (PCoA)

Table 3. Nei analysis of pairwise comparisons of oat samples identity

Tablica 3. Nei-jeva analiza parnih primerjav na osnovi genetske enakosti ovsa

284AS	285AS	285AN	284AN	'Noni'	ACC379	ACC381	ACC378	ACC380	
1.000								284AS	
0.853	1.000							285AS	
0.812	0.763	1.000						285AN	
0.852	0.812	0.872	1.000					284AN	
0.641	0.548	0.652	0.645	1.000				'Noni'	
0.633	0.628	0.682	0.632	0.823	1.000			ACC379	
0.589	0.579	0.703	0.666	0.703	0.604	1.000		ACC381	
0.245	0.299	0.283	0.261	0.416	0.456	0.361	1.000	ACC378	
0.663	0.602	0.732	0.704	0.822	0.790	0.574	0.314	1.000	ACC380

Skupno prve tri koordinate v PCoA pojasnijo 70 % variabilnosti. Najprej smo naredili analizo na kodominantnem 2n nivoju, na katerem so se oblikovale tri genetske skupine (slika 2a), kar je povezano z izvorno prisotnostjo B genoma v rodu *Avena* sp. (Loskutov, 2008). Obravnavani vzorci rastlin ovsca bolj ali manj v enakomernih deležih pripadajo vsaki izmed genetskih skupin. V nadaljevanju smo naredili še analizo genetske strukture na podlagi 6n kodominantnih podatkov. Kot je razvidno iz slike 2b, sta se tako kot pri PCoA izoblikovali le dve genetski skupini, ki sestavljata dednino dveh *Avena* sp. genomov. Bistvenih razlik v genetski strukturi med obravnavanimi vzorci rastlin ovsca nismo zaznali.

Statistično značilno odstopanje od HWE (Hardy-Weinberg Equilibrium; $P < 0,05$) smo izračunali za vzorce ovsca 285AS na lokusih AM11a in AM14a, 284AN na lokusu AM11a in ACC379 na lokusu AM14a. Rezultati primerjave alelnih profilov analiziranih vzorcev ovsca na kodominantnem 6n so prikazani na sliki 3. Najvišje vrednosti števila privatnih alelov smo izračunali pri akcesijah, ki izvirajo iz SRGB, kar nakazuje na konzervirano raznolikost, ki obstaja znotraj genskih virov, in je višja od raznolikosti pri komercialnih sortah, kjer je prisotna usmerjena selekcija.

Med vzorci AS in AN smo najvišjo vrednost privatnih alelov ter vrednost Shannonovega informacijskega indeksa določili pri vzorcu 285AS, kar kaže, da je ta vzorec najbolj genetsko raznolik in vsebuje dobro konzervirane gene, ki lahko pripadajo golemu ali navadnemu ovsu. Najvišje število različnih alelov in privatnih alelov smo izračunali pri akcesiji ACC378, ki se je tudi glede na ostale parametre genetske raznolikosti (Shanonov informacijski indeks, št. efektivnih alelov, št. skupnih alelov s frekvenco 25 % in 50 %, pričakovana heterozigotnost) izkazala kot genetsko najbolj raznolika. Genetsko sta najmanj raznolika vzorca 284AN in 285AN, ki glede na primerjave med alelnimi profili ostalih vzorcev, predstavljata pravi/nativni komponenti vzorca golega ovsca, t.j. semena s fenotipsko izraženim znakom semena brez pleve.

V nadaljevanju smo na podlagi rezultatov genetskih analiz za obravnavane vzorce ovsca izrisali filogenetsko drevo na podlagi Nei-jeve standardne genetske razdalje in UPGMA metode združevanja (ang. *unweighted pair group method with arithmetic mean*). V desnem delu filogenetskega drevesa, ki je prikazan na sliki 4, so uvrščene vse ponovitve vzorcev 284AS, 284AN, 285AS in 285AN z izjemo ene ponovitve pri vzorcu 285AN in ACC381, ki ločeno pripadata nekoliko bolj različni genetski strukturi,

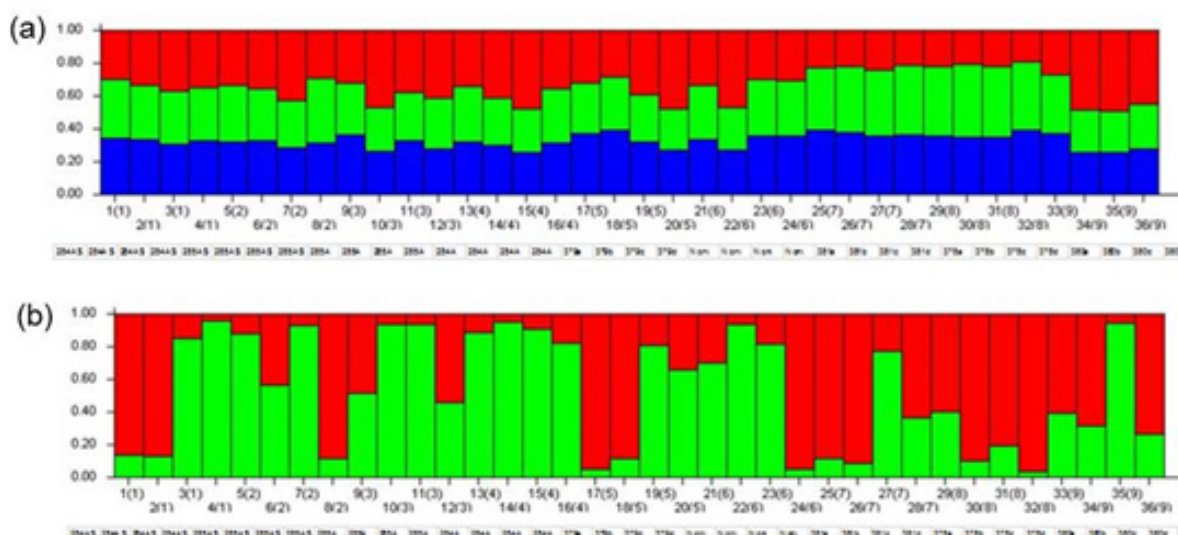


Figure 2. Genetic structure of oat samples at the 2n (a) and 6n codominant level (b)

Slika 2. Genetska struktura vzorcev ovsca na 2n (a) in 6n kodominantnem nivoju (b)

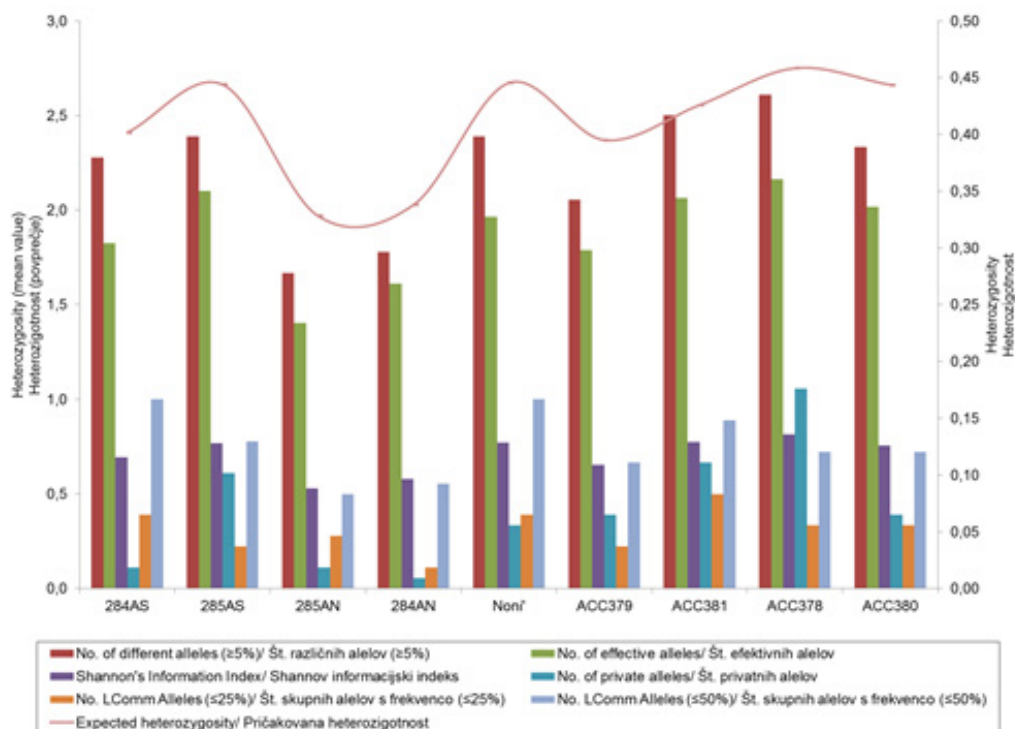


Figure 3. Comparison of allelic pattern between the studied oat samples

Slika 3. Primerjava alelnih profilov med preučevanimi vzorci ovs

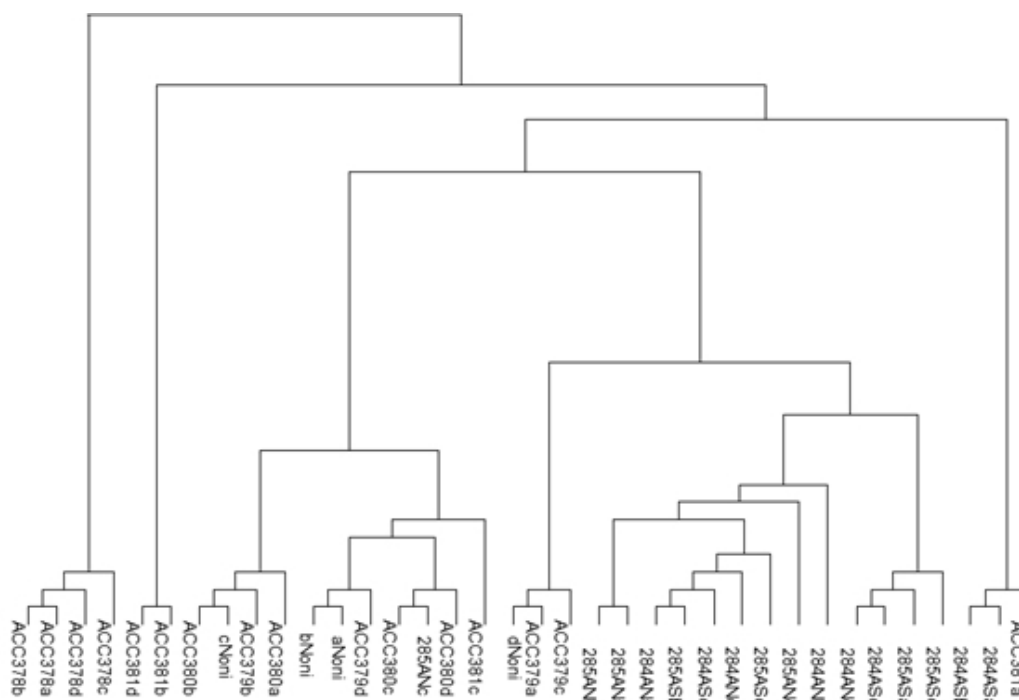


Figure 4. Genetic association of analysed oat samples within the genus *Avena* sp.

Slika 4. Genetska povezanost analiziranih vzorcev ovs znotraj rodu *Avena* sp.

ki bi v tem primeru lahko pomenila genom vrste *Avena nuda* L. ali bi predstavljala raznolikost genotipov znotraj vzorcev. V analizo smo namreč vključili po štiri genotipe posameznega vzorca, torej štiri individualne rastline, ki niso kloni in med njimi obstaja določena genetska variabilnost (Pipan in sod., 2018) tako kot pri vsaki sorti ali genskem viru. To odstopanje spet nakazuje na skupni izvor in diferenciacijo tekom domestifikacije vrst iz rodu *Avena* (Loskutov, 2008).

Ker gre za genetsko razločevanje znotraj sorte in med dvema zelo podobnima vrstama, je bilo potrebno z genetsko analizo pokriti vse možnosti: štiri individualne rastline (a, b, c, d) vsakega fenotipa golega ovsca (284AN, 284AS in 285AN, 285AS) ter po štiri individualne rastline (a, b, c, d) sorte ('Noni') in genskega vira (ACC) navadnega ovsca. Le tako smo lahko vrednotili raznolikost znotraj sort in genskih virov navadnega in golega ovsca ter genetsko raznolikost med njimi.

Rezultati te analize so nam podali sliko genetskega ozadja, znotraj katerega smo lahko primerjali genotipe med seboj. Kljub temu da smo imeli v analizi že registrirane sorte ('Kamil', 'Noni'), določena raznolikost znotraj le-teh vedno obstaja, četudi gre za samoprašno rastlinsko vrsto, in to raznolikost smo v tej študiji uspeli določiti. Na sliki 4 je prikazano, kako se dva genotipa 285ANc in ACC381a ne uvrščata skupaj ostalimi genotipi istega vzorca. Potrditev, da smo uporabili ustrezne kalkulacije in metodiko (sekvenator, alelna detekcija), je razvidna v preglednici 2, kjer se obravnavana in pričakovana heterozigotnost bistveno ne razlikujeta (razlika v povprečju na vseh 6-ih lokusih je 0,13) in ustrezata kriterijem za samoprašne rastline (Pipan in Meglič, 2019). Še enkrat bi poudarili, da uniformnost in samoprašnost ne pomenita popolne homozigotnosti. Ravno zato smo opravljali alelna detekcijo, da smo določili tudi drugačne alele in heterozigotno stanje na posameznem lokusu. In zato tudi dva genotipa na dendrogramu nista uvrščena v sklop ostalih genotipov istega vzorca. O tem priča tudi zadnji stolpec v preglednici 2, kjer smo določali število genetskih migrantov na osnovi heterozigotnih genotipov v analizi. Ugotovljeno je bilo, da je le-teh v povprečju 1,591 - največ na lokusu AM11, ki se je že v predhodnih

obravnavanjih izkazal kot najbolj informativen in uporaben pri ločevanju med *A. nuda* in *A. sativa*. Lahko bi celo sklepali, da je neke vrste genski marker, ki bi lahko bil povezan z geni/multiplimi aleli, ki določajo prisotnost pleve pri ovsu. Yan in sod. (2020) so objavili študijo, kjer so na osnovi GWAS identificirali štiri markerje, ki so povezani z genom za prisotnost pleve (N1) pri ovsu.

Pri študijah sortne/vrstne pristnosti je število uporabljenih markerjev odvisno od stopnje sorodnosti proučevanih vrst in od tega kakšni so SSR markerji. Koliko so polimorfni znotraj posamezne vrste in sorte ter ali so povezani z geni/multiplimi aleli za posamezno lastnost, ki fenotipsko loči sorte ali vrste med seboj (v tem primeru funkcionalni SSR markerji). Poleg tega so tudi drugi tipi DNA markerjev, ki so učinkoviti pri razločevanju vrst/sort in so lahko genski (CAPS, SCAR tipi); pri teh so pa razlike vidne že na kvalitativnem nivoju. V tej študiji so bile razlike med genotipi golega in navadnega ovsca neberljive na kvalitativnem nivoju, zato smo izvedli še fragmentno analizo in alelna detekcijo, kar nam je zagotovilo natančno stopnjo detekcije. Glede na izkušnje z analizami populacijske genetike lahko pri Nei-jev parnih primerjavah 75 % delež ujemanja ali manj pomeni že drugo vrsto, vse pa je odvisno od sorte, ni pa to nikjer specifično. Pri populacijskih sortah je včasih razlika med sortami večja kot med vrstami; pri variabilnosti znotraj sorte pa pomembno vlogo igra tudi samoprašnost oz. tujeprašnost vrste.

ZAKLJUČEK

V raziskavi so nas zanimali netipični fenotipi znotraj sorte golega ovsca 'Kamil', ki jih je bilo za namene identifikacije potrebno primerjati s čim večjim spektrom genskih virov navadnega ovsca, ki se pojavljajo v slovenskem pridelovalnem prostoru. Zato smo razširili izbor navadnega ovsca, da bi lažje ugotovili ali so plevenci v sorti 'Kamil' primesi navadnega ovsca ali so le »oblečena« semena te sorte golega ovsca. Skupno razmerje genotipov v analizi je zagotovilo zadovoljivo razmerje razločevanja, saj smo genotipizirali 16 genotipov/rastlin golega ovsca in 20 genotipov/rastlin navadnega ovsca.

Kljub visoki stopnji genetske podobnosti med preučevanimi devetimi vrstami/sortami/akcesijami in 36 genotipi znotraj rodu *Avena* sp., lahko na podlagi statistične obdelave in ustreznih parametrov genetske raznolikosti na kodominantnem 6n nivoju zaključimo, da vzorci 284AN, 284AS, 285AN in 285AS pripadajo isti vrsti ovsu, t.j. golemu ovsu (*Avena nuda* L.). Ta vrsta ovsu je še vedno dovolj različna od sorte 'Noni' in ostalih akcesij navadnega ovsu iz SRGB vključenih v raziskavo (ACC378, ACC379, ACC380, ACC381). Na podlagi opravljenih genetskih analiz sta se kot najbolj informativna SSR markerja za namene razločevanja med vrstama navadnega (*Avena sativa* L.) in golega ovsu (*Avena nuda* L.) izkazala AM11 in AM14 na 2n, predvsem na 6n kodominantnem nivoju. Sicer pa je izbrani set kombinacije 6-ih SSR markerjev polimorfen in informativen za razločevanje vrst iz rodu *Avena*. K rešitvi dvoma sta izmed vseh tipov analiz populacijske genetike, opravljenih v članku, največ doprinesli dve analizi, in sicer analiza parametrov genske variabilnosti (preglednica 2) in Nei-jeva analiza parnih primerjav na osnovi genetske enakosti ovsu (preglednica 3).

V nadaljevanju bi bilo smotno opraviti morfološko vrednotenje rastlin navadnega in golega ovsu tekom vegetacije. Ker študija opisuje aplikativno zgodbo in rešitev dejanskega problema, je izbor vključenih standardov ustrezen in dovolj informativen, da smo podali zanesljive zaključke, saj opisano predstavlja primer aplikativne znanosti v agronomiji z uporabo orodij populacijske genetike.

ZAHVALA

Raziskava je bila delno financirana s pomočjo raziskovalnega projekta z naslovom »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« (V4-1806), ki ga financira MKGP, ter delno v sklopu programske skupine Agrobiodiverziteta (P4-0072), ki jo financira ARRS. Zahvaljujemo se tudi

Slovenski rastlinski genski banki na Kmetijskem inštitutu Slovenije, ki nam je zagotovila akcesije navadnega ovsu.

LITERATURA

- Earl, D.A., von Holdt, B.M. (2011) Structure harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics and Resources*, 3, 429-431. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- International rules for seed testing, edition 2020 International Seed Testing Association, Bassersdorf, Switzerland. DOI: <https://www.seedtest.org/en/home.html>
- Langella, O. (2002) Population 1.2.28. Logiciel de genétique des populations. Laboratoire populations, génétique et évolution, CNRS UPR 90 34, Gif-sur-Yvette, France. <https://www.legs.cnrs-gif.fr>
- Li, C.D., Rossnagel, B.G., Scoles, G.J. (2000) The development of oat microsatellite markers and their use in identifying relationships among *Avena* species and oat cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 101, 1259-1268. DOI: <https://doi.org/10.1007/s001220051605>
- Loskutov, I.G. (2008) On evolutionary pathways of *Avena* species. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55 (2), 211-220. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10722-007-9229-2>
- Nei, M. (1972) Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106 (949), 283-292.
- Page, R.D.M. (1996) Tree View: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Bioinformatics*, 12 (4), 357-358. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/12.4.357>
- Park, S. (2001) Microsatellite Toolkit. Department of Genetics, Trinity College: Dublin. <http://acer.gen.tcd.ie/~sdepark/ms-toolkit/>
- Peakall, R., Smouse, P.E. (2006). GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 288-295. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
- Pipan, B., Meglič, V. (2019) Diversification and genetic structure of the western-to-eastern progression of European *Phaseolus vulgaris* L. germplasm. *BMC Plant Biology*, 19 (442), 1-16. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2051-0>
- Pipan, B., Zupančič, M., Blatnik, E., Dolničar, P., Meglič, V. (2018) Comparison of six genomic DNA extraction methods for molecular downstream applications of apple tree (*Malus X domestica*). *Cogent Food & Agriculture*, . <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/23311932.2018.1540094>
- Pipan, B., Žnidarčič, D., Kunstelj, N., Meglič, V. (2017) Genetic evaluation of sweetpotato accessions introduced to the central European area. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 19, (5), 1139-1150. http://jast.modares.ac.ir/article_17081_cd7e33edb6c841cd3a42a45aa01e5d4f.pdf
- Pipan, B., Šuštar Vozlič, J., Meglič, V. (2013) Genetic differentiation among sexually compatible relatives of *Brassica napus* L. *Genetika*, (Acta Biologica Iugoslavica), 45, (2), 309-327. DOI: <https://doi.org/10.2298/GENSR1302309P>
- Rusjan, D., Pipan, B., Pelengić, R., Meglič, V. (2012) Genotypic and phenotypic discrimination of grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties of the 'Vitovska' and 'Garganja' Denominations. *European Journal of Horticultural Science*, 77, (2), 84-94.
- Pritchard, J.K., Wen, X., Falush, D. (2009) Documentation for structure software: version 2.3. Chicago: University of Chicago. 39 p. http://web.stanford.edu/group/pritchardlab/home.htmlsoftware/structure2_2.html

- Schuelke, M. (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18 (2), 233-234.
DOI: <https://doi.org/10.1038/72708>
- Simončič, A., Žilič, E. eds. (2018) 120 let Kmetijski inštitut Slovenije. Ljubljana: Kmetijski inštitut Slovenije, pp 1-141.
- Song, G., Huo, P., Wu, B., Zhang, Z. (2015) A genetic linkage map of hexaploid naked oat constructed with SSR markers. *The Crop Journal*, 3 (4), 353-357.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cj.2015.01.005>
- Sortna lista poljščin, zelenjadnic, sadnih rastlin in trte za leto 2020. RS Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano. https://www.gov.si/assets/organi-v-sestavi/UVHVVR/Rastlinski-semenski-material/Publikacija-Sortna-lista/SL_2020_splet_popravljen.pdf
- Uradni list RS, št. 25/05. Zakon o semenskem materialu kmetijskih rastlin (ZSMKR). Uradni list RS, št. 25/05 – uradno prečiščeno besedilo, 41/09, 32/12, 90/12 – ZdZPVHVVR in 22/18.
- Yan, H., Ren, Z., Deng, D., Yang, K., Yang, C., Zhou, P., ... & Peng, Y. (2020). New evidence concerning the genome designations of the AC (DC) tetraploid *Avena* species. *bioRxiv*.
DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.10.02.323345>