

Lesy České republiky, s.p., Hradec Králové

VÝZKUMNÉ PROJEKTY
GRANTOVÉ SLUŽBY LČR



Souhrn projektu

ZAKLÁDÁNÍ SEMENNÝCH SADŮ DRUHÉ
GENERACE PRO BOROVICI LESNÍ

Řešitel

Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v.v.i.



Odpovědný řešitel:

Ing. Ondřej Ivanek, CSc.

Spoluřešitelé:

Ing. František Beran; Ing. Jiří Čáp; Ing. Josef Frýdl, CSc.;

Ing. Jan Kaňák; Jiřina Mannová;

Ing. Petr Novotný, Ph.D.

Strnady 2009

Obsah

1. ÚVOD	2
2. CÍL PRÁCE	3
3. PŘEHLED PROBLEMATIKY	3
4. MATERIÁL A METODIKA	8
4.1. CHARAKTERISTIKA ZÁJMOVÝCH VÝSADEB	8
4.1.1. Semenné sady	8
4.1.2. Testovací plochy	9
4.2. MĚŘENÍ A HODNOCENÍ SLEDOVANÝCH CHARAKTERISTIK	10
4.3. STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ BIOMETRICKÝCH MĚŘENÍ	13
4.4. ODBĚR A ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ PRO ANALÝZY GENOVÝCH MARKERŮ	13
4.5. ISOENZYMOVÉ ANALÝZY	14
4.6. DNA ANALÝZY	15
4.7. NÁVRH SEMENNÉHO SADU 1,5. GENERACE	16
5. VÝSLEDKY	17
5.1. BIOMETRICKÁ MĚŘENÍ	17
5.2. FENOLOGIE KVETENÍ	17
5.3. ISOENZYMOVÉ ANALÝZY	17
5.4. DNA ANALÝZY	21
5.5. NÁVRH SEMENNÉHO SADU 1,5. GENERACE	22
6. DISKUSE	26
7. ZÁVĚR	28
8. LITERATURA	29
9. PŘÍLOHY	31

1. ÚVOD

Semenné sady představují účelové výsadby selektovaných klonů, zakládané zpravidla z ramet příslušných ortet (dříve výběrových stromů) totožného klonu jako výsledek individuální selekce jedinců (stromů) a určitého šlechtitelského záměru. Výsadba ramet je provedena na základě projektu obvykle v pravidelném sponu a v takovém rozmístění, aby docházelo k dobrému vzájemnému opylení jedinců různých klonů. Lokality sadů se vybírají pokud možno tak, aby byla zachována dostatečná izolační vzdálenost od stromů a porostů téhož druhu.

Důležitým posláním semenných sadů je poskytovat v době fruktifikace hojnou a snadno přístupnou úrodu geneticky hodnotného osiva. Semenné sady jsou uznávány (zákon č. 149/2003 Sb., vyhláška č. 29/2004 Sb.) jako zdroje reprodukčního materiálu v kategorii kvalifikovaný, popř. testovaný (na základě provedených testů potomstev). U potomstev vypěstovaných z osiva semenných sadů se předpokládá heterózní efekt (tj. vyšší objemový růst, lepší kvalitativní vlastnosti, vyšší odolnost apod.), vyskytující se často u potomstev geneticky vzdálenějších rodičů. Další význam semenných sadů spočívá v uchování cenného genofondu mateřských (rodičovských) stromů.

Šlechtitelské programy pracují postupně se třemi typy populací (zdrojová, šlechtitelská, produkční). Zdrojová populace se skládá z jedinců selektovaných primární fenotypovou selekcí v porostech a její rozsah je dán jednak účelem šlechtitelského programu (konzervace genetických zdrojů nebo aktivní šlechtění) a jednak velikostí a rozmanitostí přírodních podmínek cílové oblasti, ve které má být vyšlechtěný materiál využit. Ve šlechtitelské populaci se koncentrují aktivity spojené s křížením jedinců kandidátské populace a jejich testováním ať již polními šlechtitelskými výsadbami nebo testováním genetické informace analýzami genetických markerů (NAMKOONG 1988).

Produkční populace slouží k transferu genetického zisku vygenerovaného ve šlechtitelském programu do provozních hospodářských výsadeb. Hlavními produkčními populacemi jsou semenné sady a pro klonové programy matečnice (PAULE 1992).

Úspěch šlechtitelského programu závisí již na pečlivosti výběru jedinců do kandidátské populace. Výběr by měl vycházet nejen z fenotypového projevu, ale i z postavení daného jedince v porostu vzhledem ke konkurenčním vazbám okolních jedinců (HYNEK et al. 1997).

Podle počtu selekčních cyklů „x“ v rámci šlechtitelských populací rozlišujeme semenné sady x. generace. Protože jsou SS 1. generace zakládány nejčastěji naroubováním jedinců selektovaných pouze na základě fenotypového výběru, nelze u nich očekávat vysokou míru genetické odezvy na selekci. Je proto vhodné za účelem získání geneticky kvalitnějšího osiva uskutečnit testování potomstev SS 1. generace a z pozitivně ověřených klonů založit SS vyšší generace.

Mezi 1. a 2. generací semenných sadů je možno uvažovat i tzv. 1,5. generaci, která se od druhé liší tím, že materiál pro založení nové výsadby byl stejně jako materiál pro založení

testovací plochy odebrán z roubovanců v SS 1. generace. Pro založení SS 2. generace je třeba odebrat reprodukční materiál z pozitivně otestovaných klonů na testovací ploše, který odpovídá skutečně „2. generaci“.

Poznámka: Přestože jsou v názvu projektu zmiňovány semenné sady 2. generace, již při úvodním jednání a později v průběhu řešení a oponentních řízeních se ukázalo vzhledem k časovému a finančnímu omezení projektu dosažení tohoto cíle jako nereálné. Z výše uvedených důvodů bylo řešení omezeno na návrh semenného sadu 1,5. generace, čemuž odpovídá i zpracovaný realizační výstup RV1.

2. CÍL PRÁCE

Cílem zadaného projektu je provedení genetické identifikace klonů borovice lesní s využitím isoenzymových analýz v semenném sadu 1. generace, vybraného zadavatelem, za účelem založení semenného sadu 2. generace. Zadavatelem byla vybrána i testovací plocha, na které jsou vysazena potomstva klonů, resp. ramet z uvedeného semenného sadu.

Při úvodním oponentním řízení, kdy již byly konkrétní semenný sad borovice lesní (SS č. 79 – Doubrava) a testovací plocha (Skelná Huť) známy, bylo však konstatováno, že přestože se pro tento účel jedná o nejlépe založené plochy v ČR, není splnění stanoveného cíle s využitím těchto výsadeb za dobu řešení projektu a disponibilních prostředků realizovatelné ve smyslu doslovné terminologie (sad 2. generace), a proto byla náplň zadání pozměněna na založení semenného sadu 1,5. generace. Zároveň byla do hodnocení zahrnuta i testovací plocha Nepomuk (LS Klatovy), testující semenný sad Nepomuk-Silov (ev. č. 43), který má téměř identické složení klonů rodičovských stromů jako semenný sad Doubrava.

Na základě výsledků fenotypových šetření, genetické analýzy a biometrických měření bude uskutečněn výběr konkrétních klonů pro převod semenného sadu 1. generace na semenný sad 1,5. generace. Daný výběr bude sloužit pro vlastní návrh (design) semenného sadu 1,5. generace. Formou realizačního výstupu budou v závěru řešení projektu zpracovány obecné zásady zakládání semenných sadů 1,5. generace ve formě metodiky.

3. PŘEHLED PROBLEMATIKY

Semenné sady nejsou pouze reprodukčními výsadbami, ale plní zároveň úlohu šlechtitelských populací. Jejich účelem tedy není pouze maximální produkce semen, ale také dosažení vysoké genetické kvality osiva. Při dosahování tohoto cíle jsou uplatňovány dvě šlechtitelské metody: selekce rodičovských stromů (klonů) a hybridizace mezi těmito klony v rámci semenného sadu při vyloučení či alespoň minimalizaci nežádoucího sprášení z okolních lesních porostů téhož druhu lesní dřeviny uplatněním určité izolační vzdálenosti.

Semenné sady představují syntetické, umělé populace, resp. soubory klonů, jejichž původ je v některých případech dosti rozmanitý. V rámci jednoho sadu byly v minulosti často soustředovány klony různého původu, mnohdy též z různých přírodních lesních oblastí a

lesních vegetačních stupňů. Semenné sady 2. generace měly být v ČR s využitím ověřených klonů zakládány ve druhé polovině 90. let a později (ŠINDELÁŘ, VAŠÍČEK et SKALICKÝ 1989). Dosud však v ČR dosud žádný uznávaný semenný sad 2. generace neexistuje.

Jedním z nejdůležitějších genetických parametrů zvažovaných ve šlechtitelských programech a strategiích je genetická diverzita. Její velikost přispívá ke stabilitě porostů a odolnosti vůči biotickým a abiotickým činitelům. Genetickou diverzitu je možné vyjádřit vztahem:

$$GD = 1 - \Theta$$

, kde Θ představuje tzv. „group coancestry“, která je definována jako průměrný koeficient příbuznosti mezi jedinci v populaci (COCKERHAM 1967).

Genetickou diverzitu je možné sledovat z více aspektů, např. jako alelickou diverzitu popisovanou počtem polymorfních lokusů, počtem alel na lokus, podílem heterozygotních lokusů nebo jako genovou diverzitu definovanou pravděpodobností, že alely na sledovaném lokusu nejsou totožné svým původem (ROSVALL 1999). Mezi komplexní kritéria genetické diverzity s obecnější platností patří Shannonův index H (MAGURRAN 2004) a Rao index kvadratické entropie R (BOTTA-DUKÁT 2005), kdy výhodou druhého z nich je robustnost, tj. nízká citlivost dosaženého výsledku k počtu srovnávaných lokusů.

Ve šlechtění lesních dřevin je genetická diverzita vhodně aproximována efektivní velikostí populace N_e , která je definována jako počet neinbredních, nepřibuzných jedinců ekvivalentní skutečnému stavu populace (LINDGREN, GEA et JEFFERSON 1997).

Koeficienty příbuznosti jsou definovány pravděpodobností, s jakou získáme v potomstvu jedince s lokusem obsazeným alelami, které jsou svým původem identické (MALECOT 1948). Takto definované „group coancestry“ zároveň stanovují inbreedingový koeficient v generaci potomstev, která vzejde křížením jedinců zahrnutých ve výpočtu „group coancestry“.

Kontrola inbreedingu, tj. stupně příbuzenského křížení, v rámci šlechtění lesních dřevin je stěžejní pro celkový úspěch programu. Vysoký podíl příbuzenského křížení může vyústit v inbreedingovou depresi. Z dlouhodobých experimentů s inbredním materiálem je možné pozorovat změny ve vývoji průměrů potomstev v čase. Potomstva projevující se jako méně produktivní v časném období jsou naopak nejproduktivnější v pozdějších letech. Celkově ovšem inbrední potomstva nikdy nedosáhnou produkčních kvalit potomstev z volného sprášení (ERIKSSON, SCHELANDER et ÅKEBRAND 1973).

Intenzita projevu inbreedingové deprese je závislá na počtu škodlivých alel jak v populaci, tak u každého jedince zvláště, což je závislé na historii vývoje genetické struktury populace. Tyto důsledky snižují efektivitu semenných sadů v množství produkovaného osiva i v jeho kvalitě. Tím redukuje realizovaný genetický zisk (SKRØPPA 1996, ANDERSSON et al. 1974).

Vyvážeností mezi genetickým ziskem a příbuzenským křížením (inbreedingem) v semenných sadech se zabývali OLSSON, LINDGREN et LI (2001). Tradiční způsob, jak se vyhnout inbreedingu a následnému snížení schopnosti reprodukce, resp. fitness, spočívá ve využívání pouze takových klonů při zakládání semenných sadů, které nejsou vzájemně příbuzné. S tím, jak šlechtitelské programy směřují k sadům vyšších generací, se příbuzenský vztah mezi kandidáty pro selekci stává pravděpodobnějším. Autoři referují o tradiční metodě

restringované omezené selekce jedinců (restricted selection, RS) s vysokou šlechtitelskou hodnotou a se současným vyloučením příbuzenského vztahu mezi nimi a navrhuji dále alternativní selekční metodu GMS (Group Merit Selection), založenou na selekci klonových skupin, které maximalizují očekávanou genetickou hodnotu, tj. genetický zisk, kde tzv. fitness, tj. schopnost reprodukce jedince, odpovídající určitému genotypu je snížena v důsledku inbreedingu.

Otázka příbuzenských relací mezi klony v semenných sadech souvisí i s genetickou proměnlivostí. Ta se projevuje na několika úrovních (IVANEK et PROCHÁZKOVÁ 2008). Jde o znaky, zjistitelné morfologicky na fenotypové úrovni a dále o znaky, měřitelné a vyhodnotitelné na základě kvantitativních genetických metod, s využitím genových markerů, kde v úvahu přicházejí monoterpeny (KAŇÁK 1999), isoenzymy a DNA (PAULE 1992). Další typ představuje proměnlivost chromozomální nebo cytogenetická. Z hlediska sledování proměnlivosti populací a ověřování identity klonů a roubovanců v semenných sadech se významně uplatňuje sledování polymorfismu na úrovni enzymů. Genetickou proměnlivost přímo na úrovni DNA umožňují molekulárně genetické metody jako RFLP, PCR, mikrosatelity či přímé sekvenování DNA. Z hlediska předkládané metodiky je důležitá proměnlivost na enzymatické úrovni, kdy se při ověřování identity klonů a roubovanců vychází z polymorfismu konkrétních lokusů, jejich počtu a dalších parametrů. Výsledky isoenzymových analýz roubovanců, zejména v některých semenných sadech borovice lesní prokázaly různě vysoký podíl nesprávně označených (evidovaných) roubovanců. K této situaci může dojít různými způsoby, počínaje chybným označením roubů při sběru, roubovanců při roubování i při výsadbě, při vylepšování (nahrazování uhynulých roubovanců jedinci stejného klonu nebo i klonů odlišných) nebo přehlédnutím toho, že po uhynutí roubu v sadu roste pouze podnož, vedená jako roubovanec. Zásahy v semenných sadech, které by vedly ke změně údajů dokumentace, musí být povoleny, evidovány a registrovány pověřenou osobou (Příloha č. 26 k vyhlášce č. 29/2004). Jak však ukazují výsledky inventarizace v sadech, v nezanedbatelném počtu případů nejsou tyto požadavky dodržovány. Problémy týkající se skutečné identity roubovanců jsou známy u semenných sadů borovice lesní, modřínu opadavého a smrku ztepilého a dokladovány i v zahraničí (např. Slovensko, SRN).

Současné semenné sady jsou navrhovány většinou s vyváženým zastoupením všech selektovaných jedinců. Tohoto způsobu je využíváno hlavně v semenných sadech 1. generací, kdy jedinci jsou selektováni na základě fenotypového projevu bez dostupných informací o jejich genetické kvalitě. V případě, že jsou již dostupné informace o genetické kvalitě jedinců z testů potomstev, je možné management semenného sadu upravit se zřetelem na tyto informace. Jedním z klasických opatření, reflektujících tyto nové informace, je genetická probírka, kterou je možné provést na základě strategie lineárního zastoupení klonů (LINDGREN et MATHESON 1986), kdy počet jedinců po probírce je přímo úměrný šlechtitelské hodnotě daného jedince ze souboru pozitivně ověřených klonů (jde o nevyváženou selekci). Nevýhodou tohoto postupu je ztráta produkce osiva, která je z ekonomického hlediska mnohem větší než příjmy z dodatečného zvýšení genetického zisku. Z tohoto důvodu je často genetická probírka nahrazována selektivním sběrem osiva, kdy osivo ze semenného sadu je sbíráno samostatně z jednotlivých klonů a poté je vytvořena směs osiva podle optimálních proporcí závislých na genetické kvalitě jednotlivých klonů. Tento postup sice není z hlediska genetického zisku tak efektivní jako genetická probírka, avšak udržuje genetickou diverzitu na podstatně vyšší úrovni. Jako optimální řešení dodatečného navýšení genetického zisku se jeví kombinace obou těchto postupů, kdy se provede mírná genetická probírka s následnou intenzivnější selekcí jedinců pro selektivní sběr osiva (KANG et al. 2005).

V souvislosti s problémem inbreedingu uvádějí GIERTYCH et al. (1991) na základě isoenzymových analýz pro semenné sady borovice lesní, že frekvence semen ze samooplození klesá v semenném sadu ve většině případů na přijatelně nízkou úroveň při zastoupení cca 50 klonů. Při dalším navyšování počtu klonů není již pokles obvykle významný.

K interpretaci výsledků isoenzymových analýz slouží metodické přístupy, používané při identifikaci lesních dřevin v zahraničí (CHELIAK et PITEL 1984, BERGMANN et HATTEMER 1995, HERTEL 1997) a v ČR (PROCHÁZKOVÁ et al. 2004, IVANEK et PROCHÁZKOVÁ 2006). Isoenzymových analýz využívají při sledování genetické struktury semenných sadů např. již HACKER et BERGMANN (1991), GÖMÖRY et PAULE (1992) či TRÖBER et HAASEMANN (2000). BRUCHÁNIK (2001) zjistil značný podíl chybně evidovaných ramet, resp. nehomogenních klonů v semenných sadech smrku ztepilého, borovice lesní a modřínu opadavého. Problematiku semenných sadů v kontextu přístupu a sdílení užitku genetických zdrojů v rámci EU prezentovali IVANEK et al. (2008) a BURIÁNEK et IVANEK (2008).

V ČR byl dílčí šlechtitelský program pro založení semenných sadů borovice lesní 2. generace navržen ŠINDELÁŘEM (1992). Záměrem bylo zvýšení objemové produkce, jakosti a odolnosti populací borovice lesní. Výzkumné plochy s potomstvy výběrových (dnes rodičovských) stromů z volného sprášení byly založeny v roce 1990. Vzhledem k povaze vysazeného materiálu se tedy předpokládalo pouze posouzení hodnoty aditivní genetické variance a dědivosti pro testované populace, tj. nemožnost odlišit odhady neaditivní genetické variance. Při testech tohoto druhu se do výsledků dostává i nekontrolovaný podíl inbreedingu, což je může celkově zkreslovat (PAULE 1989 ex ŠINDELÁŘ 1992).

Z hlediska návrhu rozmístění jedinců v semenném sadu je možné definovat tři typy semenných sadů:

- 1) tzv. „free love“ návrhy (založeny bez jakéhokoliv návrhu rozmístění jedinců),
- 2) návrhy náhodného rozmístění (jedinci jsou rozmístěni náhodně po celé ploše semenného sadu, nebo v rámci jednotlivých bloků, obvykle s omezením minimálního odstupu ramet stejného klonu),
- 3) návrhy systematického rozmístění (jedinci systematicky rozmístěni po celé ploše semenného sadu).

Mezi hlavní problémy, které je třeba v rámci návrhu semenného sadu řešit, patří:

- 1) omezení kontaminace úrody osiva pylem z okolních porostů,
- 2) vytvoření takových podmínek, aby sprášení bylo rovnoměrné po celé ploše sadu,
- 3) zajištění maximálního počtu kombinací pomocí rozmístěním, s cílem zajistit maximální genetickou proměnlivost,
- 4) minimalizace inbreedingu (VAN BUIJTENEN 1971).

Pro návrh rozmístění jedinců v semenném sadu existují softwary, které navrhují systematické rozmístění ramet jednotlivých klonů v rámci pravoúhlých, trojúhelníkových a hexagonálních parcel podle předem stanovených požadavků (CHAKRAVARTY et BAGCHI 1993, BELL et FLETCHER 1978). V současné době je snaha vytvořit návrhy rozmístění jedinců na základě optimalizačních algoritmů, které jsou založeny na minimalizaci pravděpodobnosti příbuzenského křížení. Tyto programy umožňují naopak obrovskou variabilitu v nastavení vstupních parametrů (LSTIBŮREK et EL-KASSABY 2008).

Současné dlouhodobé šlechtitelské programy jsou založeny na maximální konzervaci genových zdrojů, přičemž dochází k neefektivnímu držení i méně kvalitních genotypů ve šlechtitelských programech. To prodražuje šlechtitelské programy o testování těchto méně kvalitních jedinců. Tyto náklady by naopak měly být vloženy do rozsáhlejšího testování nejlepších jedinců. Pro tvorbu šlechtitelských populací je dnes nejčastěji využívanou metodou vyvážená selekce, kdy z každého potomstva se selektuje nejlepší jedinec, příp. několik nejlepších jedinců. V některých progresivnějších programech se využívá nevyváženého zastoupení jednotlivých selektovaných potomstev (LINDGREN et MULLIN 1997, ANDERSSON et al. 1999). Pro tvorbu produkčních populací se využívá nevyváženého zastoupení selektovaných genotypů v závislosti na jejich genetické kvalitě (LINDGREN et MATHESON 1986). Tato nevyváženost zastoupení generuje ve svém důsledku dodatečný genetický zisk (ZHENG et al. 1997).

Závažným problémem především u těch sadů, které jsou zaměřené na záchranu a využití genofondu ohrožených druhů, může být asynchronní kvetení klonů. Klony v těchto typech sadů totiž mohou pocházet z různých oblastí, z různých LVS a jejich fáze kvetení mohou být časově posunuté natolik, že se navzájem nemohou opylit. V praxi to znamená, že v daném semenném sadu jsou některé klony zbytečné, protože se nemohou zúčastnit plození, neboť je jejich fáze kvetení výrazně posunuta před nebo za termín kvetení ostatních klonů.

V semenných sadech borovice lesní, zakládaných v ČR od konce 70. let minulého století, jsou však už zastoupeny výhradně klony regionálních odrůd (ekotypů) ze stejné PLO a stejného LVS a pouze u některých z nich tvoří nepodstatnou příměs klony z jiných oblastí. U těchto semenných sadů je tedy kvetení poměrně uniformní a časově odpovídá kvetení okolních borových porostů. Určitá variabilita byla pozorována v letošním roce u semenného sadu Silov u Nepomuku, ta však byla způsobená spíše polohou tohoto sadu – mírný svah, jehož spodní část je ve výrazné inverzní poloze (mrazová kotlina). Tento semenný sad je společný pro borovici a modřín a část úrody modřínu je každoročně znehodnocena pozdními mrazy právě ve spodní části sadu.

Synchronizace kvetení semenného sadu s místními okolními porosty téhož druhu může do jisté míry znamenat problém kontaminace semenného sadu pylem z okolí. Odhady pylové kontaminace v semenných sadech značně kolísají, ale většinou jsou poměrně vysoké, často 50 % i více. S ohledem na to, že borový pyl může v ideálních podmínkách doletět až desítky kilometrů, zdají se být opatření pro zabránění kontaminace z okolí zbytečná (vzdálenost od okolních porostů, izolační pásy jiných druhů dřevin apod.). Je však více než pravděpodobné, že právě vzdálenost pylového producenta a jeho receptora je pro úspěšné opylení zásadní a rozhodující. Dopad pylu (záchyt) významně klesá ve vzdálenosti řádu několika metrů až desítek metrů od zdroje.

V této souvislosti je třeba zmínit i možnost umístění semenného sadu *in situ* nebo *ex situ*. Obecně vzato je umísťování *in situ* ze všech možných hledisek mnohem výhodnější a není-li k tomu pádný důvod (např. limitní podmínky pro přežití, imise apod.), umístění *ex situ* se raději nevolí, neboť díky srovnávání fenofází kvetení semenného sadu s jeho okolím lze očekávat kontaminaci nevhodným pylem.

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1. Charakteristika zájmových výsadeb

4.1.1. Semenné sady

Jak již bylo uvedeno, do testování byly zahrnuty dva semenné sady (tab. 1), svým složením téměř identické a dvě k nim příslušné testovací plochy. SS č. 79 – Doubrava byl založen o 5 let později a na téměř 3× větší rozloze než SS č. 43 – Nepomuk-Silov. V obou semenných sadech jsou zastoupeny téměř výhradně ramety západočeské provenience (viz přílohy č. 1 a 2).

Tab. 1 – Charakteristiky semenných sadů

SEMENNÝ SAD:	Doubrava	Nepomuk-Silov
Evidenční číslo:	79	43
LČR, lesní správa	Plasy	Klatovy
GPS	49°54'31.034"N, 13°26'33.605"E	49°28'52.587"N, 13°31'41.536"E
PLO	6	6
SLT	3 I	4 S
Hospodářský soubor	8241	451
Počet klonů	87	45
Počet ramet	1165	410
Celková plocha /ha/	6,48	2,24
Rok založení	1980	1975
LVS	2	4
Nadmořská výška	380	480-500
Testován na ploše:	Skelná Huť	Nepomuk



Foto 1 – Semenný sad č. 79 – Doubrava (duben 2008, J. Chládek)

4.1.2. Testovací plochy

Biometrická měření byla prováděna v Západočeském kraji na dvou testovacích plochách, založených v 90. letech pracovníkem LČR, s. p. Ing. Oldřichem Hrdličkou – viz tabulku 2. Testovací plocha Skelná Huť (LS Plasy), viz přílohu č. 3, testuje semenný sad č. 79 – Doubrava (LS Plasy) a testovací plocha Nepomuk (LS Klatovy), viz přílohu č. 4, testuje semenný sad Nepomuk-Silov. Oba tyto sady mají ale převážnou část klonů společných, takže lze testovat na obou plochách potomstva stejných klonů.

Tab. 2 – Charakteristiky testovacích ploch

PLOCHA:	Skelná Huť	Nepomuk
Lesní správa	Plasy	Klatovy
GPS	49°55'53.489"N, 13°6'43.268"E	49°29'40.735"N, 13°33'5.702"E
SLT	5K5	3S1
Hospodářský soubor	133	453
Počet potomstev	85 (klonů) 320 (ramet)	38 (klonů)
Počet parcel	960 + (7 kontroly)	163 + (3+3 kontroly)
Počet opakování	3 (potomstev ramet)	4 (potomstev klonů)
Celková plocha /ha/	1,23	0,81
Rok založení	1994	1991
LVS	5	3
Nadmořská výška	610	490
Testuje semenný sad:	Doubrava	Nepomuk-Silov

Sběr šišek pro získání osiva na založení obou testovacích ploch byl prováděn osobně ing. Hrdličkou. Jednotlivé partie šišek byly dovezeny do Arboreta Sofronka, kde byly separovaně vylušteny a uskladněny do doby jarního výsevu.

V SS Doubrava byl proveden sběr šišek podle jednotlivých ramet a na testovací plochu bylo sázeno každé potomstvo ve 3 opakováních. Každé opakování bylo reprezentováno 10 sazenicemi ve sloupci po 0,7 m, jednotlivé sloupce byly od sebe vzdáleny 1,40 m, tedy klasický spon, používaný v lesnickém provozu.

V SS Nepomuk-Silov byly šišky sbírány pouze podle jednotlivých klonů. Výsadba testovací plochy byla prováděna opět ve sponu 0,7×1,4 m, v parcelách po 50 sazenicích (5×10 řad) ve 4 opakováních.

Před měřením byly obě plochy posouzeny z hlediska homogenity a možnosti ovlivnění testovaných potomstev stanovištěm (okrajem porostu, expozicí, reliéfem, charakterem půdního profilu, vláhou apod.).

Testovací plocha Skelná Huť byla částečně založena v místě bývalé lesní školky. Paradoxně právě tato část musela být z hodnocení vypuštěna pro vysoké ztráty, zaviněné dovezeným nevhodným substrátem (příloha 3). Zbývající část plochy byla posouzena jako homogenní a byla zařazena do měření. Přestože část plochy byla z hodnocení vypuštěna, neovlivnilo to kvantitativní ani kvalitativní parametry měřené části plochy.

Testovací plocha Nepomuk, umístěná na okraji rozsáhlejšího lesního komplexu, ale s dostatečnou izolační vzdáleností, byla uznána jako vhodná pro měření a hodnocení celá.

Velmi důležitá byla i obnova stabilizace obou ploch, neboť u každého posuzovaného stromu musela být naprostá jistota jeho původu. Proto byla věnována přípravě ploch na měření náležitá pozornost.

4.2. Měření a hodnocení sledovaných charakteristik

Všechny stromy na obou testovacích plochách byly měřeny a hodnoceny stejným způsobem. Z kvantitativních znaků byla sledována jejich výška a tloušťka, z kvalitativních znaků především tvar kmene a mortalita. Dalšími kvalitativními znaky jsou i rozsah, tloušťka a charakter větvení.

Výška

U všech jedinců na obou plochách byla měřena výška. Na ploše Skelná Huť, kde se výšky borovic pohybovaly mezi 4 až 8 metry, byla k měření použita teleskopická výškoměrná lať zn. Nokkia s přesností na cm, na ploše Nepomuk, která je o 3 roky starší a stromy jsou vyšší (cca 8-12 m), pak výškoměr Vertex III s přesností na 10 cm.

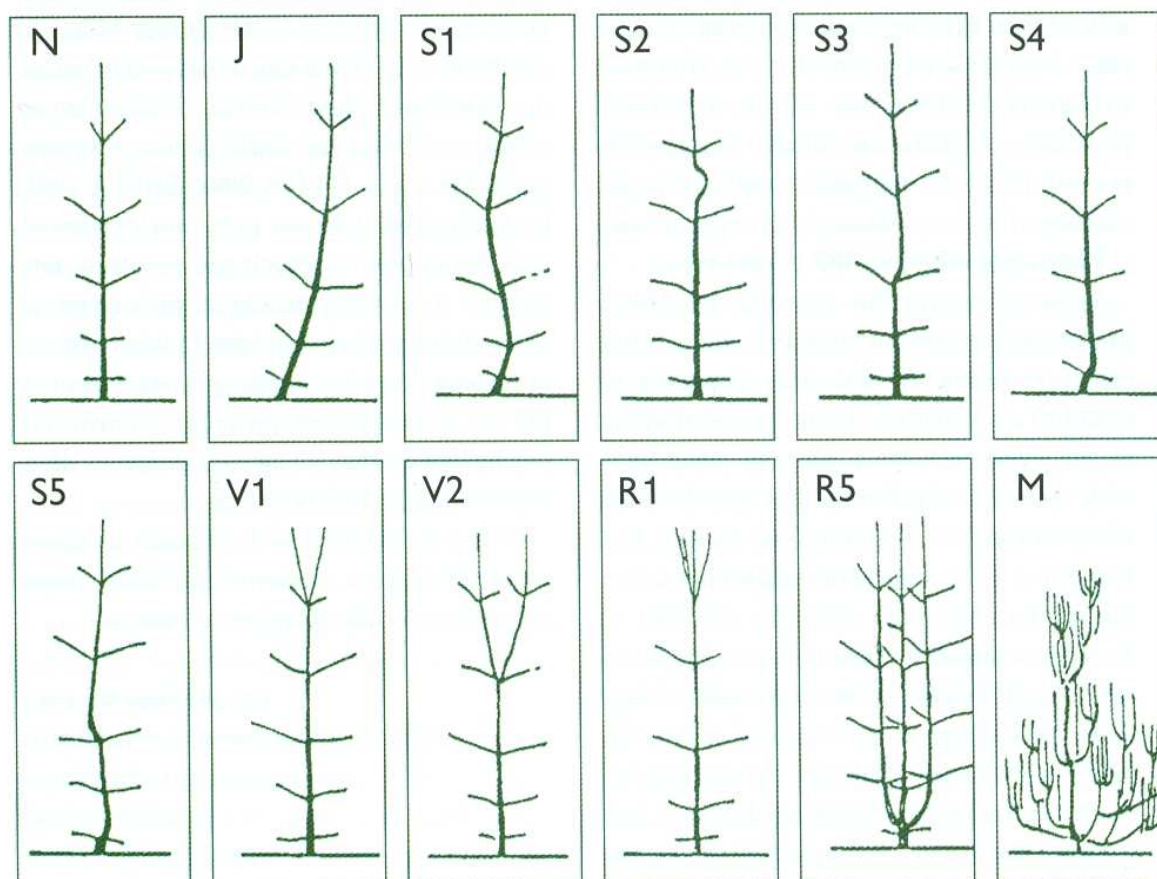
Výčetní tloušťka ($d_{1,3}$)

U všech stromů na obou plochách byla měřena tloušťka ve výšce 1,3 m. Pro větší přesnost byl měřen obvod kmínku, přepočítaný na průměr s přesností 0,5 cm.

Tvar kmene

Z kvalitativních znaků byl u všech jedinců sledován tvar kmene (obr. 1). Klasifikační stupnice byla pro účely projektu zjednodušena. Rovný vzpřímený kmen bez deformací byl značen „N“ (normální), tvary deformací pak jako „J“ – jednostranně prohnutý, „S“ – dvoustranně prohnutý, „V“ – vidlice a „R“ – rozsocha. Tvary J a S pak byly ještě doplněny buď indexem „a“ v případě mírné deformace, způsobené růstem, poraněním apod., resp. indexem „z“ v případě silné deformace, kde se jedná o nezvratnou deformaci i do budoucna, patrně geneticky podmíněnou. V hodnocení tvaru kmene je sestupné pořadí těchto deformací podle závažnosti N, Ja, Sa, Jz, Sz, V a R, kdy stromy s typy Jz, Sz, V a R jsou brány jako naprosto nevyhovující a jejich nositelé budou vyloučeni z kandidátské populace.

Poznámka: Na lokalitě Nepomuk byla užitá jednodušší numerická klasifikační stupnice: 0 (N), 1 (Ja + Sa), 2 (Sa + Sz), 3 (V + R).



Obr. 1 – Klasifikace tvaru kmene (NÁROVCOVÁ, NÁROVEC et ČERMÁK 2004)

Větvení – rozsah, tloušťka a charakter

Sledování a hodnocení této charakteristiky bylo zahájeno s tím, že preferován byl pravý až tupý úhel a naopak penalizován ostrý úhel. Měřila se i síla (průměr) a počet větví v určitém přeslenu. Při posuzování testovací výsadby byl zvolen způsob ano – ne, tzn. jestli je větvení únosné, nebo neúnosné. Po vyhodnocení cca třetiny plochy jsme sledování vyhodnotili a dospěli k závěru, že:

- síla větví je v přímé korelaci s tloušťkou kmínku, tedy čím silnější $d_{1,3}$, tím silnější větve,
- úhel větví, který je příliš ostrý a který jsme označili za neúnosný, byl už zaznamenán v hodnocení tvaru kmene u konkrétního jedince jako deformace typu „V“.

Na základě těchto poznatků bylo rozhodnuto tuto charakteristiku v daném věku potomstev dále nehodnotit.

Mortalita

Na obou plochách byla sledována a evidována mortalita, i když již byla v obou případech v minulosti provedena šetrná probírka, která byla zaměřena především na suché a ustupující jedince. V průběhu měření a hodnocení byly evidentně slabé a ustupující borovice vynechány.

Fenologie kvetení

Na doporučení oponentů bylo provedeno sledování fenologie kvetení semenného sadu. Z technických důvodů bylo jednodušší provést kompletní šetření všech klonů a ramet v semenném sadu Silov u Nepomuku (2,2 ha).

Sledování fenologie kvetení bylo prováděno ve třech termínech, vždy po 10 dnech, a to: 5. května, 15. května a 25. května 2009. Byl sledován stav samčích a samičích květenství (prašníků a šištic) a denzita květenství na jednotlivých rametách podle metodiky, vytvořené pro tento účel a zpřesněné během sledování.

Metodika sledování fenologie kvetení semenných sadů borovice lesní:

P – prašníky (samčí květenství)

S – šištice (samičí květenství)

Vývoj kvetení:

- 0 – prašníky nebo šištice dosud málo vyvinuté a kryté obaly,
- 1 – butonizace: prašníky i šištice již patrné (vyvinuté), nekryté obaly, avšak uzavřené,
- 2 – 10 % zralých (pyl práší nebo šištice „otevřené“),
- 3 – 50 % - dtto -,
- 4 – 100 % - dtto -,
- 5 – odkvět 100 % (prašníky prázdné, začínají opadávat, šištice uzavřené a zřetelně se odklánějí od osy prýtu).

Poznámka: Butonizace je fenologická růstová fáze u rostlin, zahrnující celý proces tvorby květních poupat (od okamžiku jejich vzniku až po plně dorostlá poupata).

Denzita květenství:

0 – květenství chybí

A – málo

B – středně

C – hodně

D – mimořádně hodně

Poznámka: Veškerá pozorování denzity se vztahují na relativní množství, tzn. posuzují možnosti každého konkrétního stromu (ramety) zvlášť.

Barva prašníků:

(z) – žlutá

(c) – červená

Příklad zápisu pro jednu rametu:

P 2A(z), S 1B

P 3C(c), S 2B

Sledování je zapisováno přímo do plánu sadu do políčka příslušné ramety, každý plánek je tedy nutné opatřit datem měření, tj. každý termín pozorování má samostatný plánek.

Pozorování by mělo být zahájeno nejdéle ve stadiu butonizace u většiny ramet a mělo by být opakováno minimálně 1× týdně do doby úplného odkvětu většiny ramet.

Na každé rametě byl sledován zvlášť stav samčích a zvlášť stav samičích šištic. U prašníků byla také sledována jejich barva, přičemž se vzhledem k převažující žluté barvě zaznamenávaly pouze červené prašníky.

4.3. Statistické zpracování biometrických měření

Cílem zvažované selekce v semenném sadu, tj. převod stávajících sadů první generace na sady 1,5. generace, je navýšení genetického zisku u sledovaných znaků. Genetický zisk bude realizován v provozních podmínkách při využití reprodukčního materiálu původem z těchto sadů.

U zvažovaných znaků v tomto projektu převažuje aditivní složka genetického rozptylu, navíc se empiricky předpokládá dominantní podíl genů s malým účinkem. Budeme tedy předpokládat (a ověřovat) normalitu rozdělení sledovaných znaků. Při přenosu specifické alely (funkční formy genu) z rodiče na potomka je tedy důraz kladen na její aditivní účinek s ohledem na proměnlivost sledovaného znaku. Prostý součet aditivních účinků všech těchto alel pak označujeme jako tzv. šlechtitelskou hodnotu jedince. Odhad šlechtitelské hodnoty se pak uplatňuje jako selekční kritérium.

Pro odhad šlechtitelských hodnot bylo využito smíšených lineárních modelů. V obecné rovině můžeme deklarovat závislost:

$$y = c_1 b_1 + c_2 b_2 + \dots + c_n b_n$$

kde c_1, c_2, \dots, c_n jsou konstanty a b_1, b_2, \dots, b_n jsou neznámé parametry. Předmětem statistické analýzy je odhad (označujeme \hat{y}) výše uvedené parametrické funkce. Obvykle předpokládáme lineární vztah mezi parametry této funkce. Z velkého počtu řešení (nestranných lineárních odhadů) pak vybíráme takové, které vykazují minimální rozptyl. Odhady šlechtitelských hodnot pak často označujeme jako tzv. BLUP hodnoty (jsou nejlepším nestranným lineárním odhadem skutečných šlechtitelských hodnot). Odhady rozptylu se odhadují z dat modifikovanou metodou maximální věrohodnosti (restricted maximum likelihood, REML).

Dále jsme vycházeli z původního schématu výsadby, resp. náhodného uspořádání potomstev v rámci dané lokality. Zvažovali jsme fixní účinek lokality a náhodný účinek aditivní genetické hodnoty na sledovaných znacích. Alternativně jsme testovali model, kde se předpokládá pozitivní korelace sousedních měření (\mathbf{R} je modelována AR1 maticí).

Poznámka: Výše uvedené analýzy (REML, BLUP) byly provedeny na pracovišti KDŠLD FLD ČZU v Praze s využitím software ASReml.

4.4. Odběr a zpracování vzorků pro analýzy genových markerů

V období vegetačního klidu, tj. v březnu až dubnu v letech 2008 a 2009, byly z vybraných ramet v semenném sadu č. 79 – Doubrava provedeny odběry vzorků větví borovice lesní (*Pinus sylvestris* L.) s dormantními pupeny, odpovídajících celkem 691 rametám z celkového množství 1 165 v sadu (viz přílohu 1). Dále bylo odebráno 24 vzorků z rodičovských stromů (ortet). Větve byly uskladněny v plastických sáčcích při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do doby zpracování. Odběr vzorků byl proveden v následujícím sledu (uvedená data se vztahují vždy k poslednímu dni každého z odběrů):

- 26. 3. 2008: orientační odběr 44 vzorků příslušejících 8 klonům (provedeno za účelem odhadu homogenity klonů ve sledovaném semenném sadu).

- 8. 4. 2008: odběr všech ramet tří vybraných kvalitních klonů za účelem jejich genetického mapování, tj. klonu č. 2102 (7 ramet), č. 2991 (22 ramet) a č. 2994 (10 ramet), tedy celkem 39 vzorků. Uvedené klony byly vybrány na základě výsledků biometrických údajů, provedených na testovací ploše Skelná Huť. Za kritérium výběru byla zvolena průměrná hodnota z celkových výšek potomstev pro každý klon s přihlédnutím k tvaru kmene. Takto byli vybráni jedinci na základě biometrického měření všech jedinců testovaných potomstev z r. 2000 (z první pětilice) a měření jednoho opakování z r. 2007 (z horního kvartilu).

- 8. 4. 2008: odběr ramet za účelem provedení genetického screeningu sadu - náhodný výběr v počtu jedné až tří ramet od 85 z celkového počtu 87 klonů v sadu: 53 trojic, 22 dvojic a 10 jedinců, tj. celkem 213 ramet každého klonu. *Pozn.:* Pohyblivý počet odebraných ramet při tomto způsobu odběru byl dán jednak přednostním odběrem vyššího počtu ramet u klonů s nadprůměrným růstem a dále tím, že z celkového počtu klonů v sadu bylo 11 klonů zastoupeno pouze 1 rametou a 4 klony pouze 2 rametami.

- 8. 3. & 18. 3. 2009: odběr ramet za účelem doplnění genetického screeningu sadu - náhodný výběr do dosažení počtu 7 ramet od každého klonu v sadu, celkem 439 ramet.

Pozn.: Druhý odběr v těsném časovém sledu byl proveden v zájmu zajištění většího množství biologického materiálu. Toto rozhodnutí bylo přijato na základě informací, získaných ve spolupráci s isoenzymovou laboratoří institutu Bayerisches Amt für forstliche Saat- und Pflanzenzucht (ASP) v Teisendorfu, Bavorsko (SRN), během zahraniční stáže, uskutečněné ve dnech 11.-13. 3. 2009 (viz též kap. 4.5.). V zájmu dosažení maximální kvality a reprodukovatelnosti získaných výsledků bylo na tomto pracovišti (s využitím vzorků dormantních pupenů ramet ze semenného sadu č. 79 – Doubrava) úspěšně provedeno mezilaboratorní porovnání a byla zde rovněž navržena modifikace metodických postupů, která však obnáší vyšší spotřebu biologického materiálu. V průběhu druhého odběru, tj. 18. 3., byl rovněž proveden doplňující odběr dormantních vzorků podnoží (16 jedinců, představujících izolované podnože bez roubovanců) pro jejich případné orientační genetické srovnání s rametami.

- 3. 4. 2009: odběr vzorků 24 rodičovských stromů (ortet). Odběr 14 vzorků byl proveden za přítomnosti lesního správce LS LČR Plasy (Ing. J. Štich). U 10 vzorků se jedná o anonymizované vzorky, jejichž identifikaci má v současné době záměrně k dispozici pouze zadavatel (LČR, s. p., Ing. O. Hrdlička) z důvodu nestranného provedení analýz.

4.5. Isoenzymové analýzy

Vzorky odebraných pupenů (1-2 vzrostné vrcholy) byly v r. 2008 podrobeny extrakci enzymů homogenizací 5-10 mg rostlinného pletiva s 40-60 µl extrakčního pufru. Isoenzymy byly děleny jednorozměrnou horizontální elektroforézou na škrobovém gelu (hydrolyzovaný škrob Sigma-Aldrich pro elektroforézu) při 3 °C s použitím Tris-citrátového pufráčnického systému. Dělení isoenzymů probíhalo na elektroforetické lince Multiphor II Pharmacia Biotech. Isoenzymové analýzy byly provedeny pro glukózo-6-fosfátdehydrogenázu (G-6-PDH),

šikimátdehydrogenázu (SDH), 6-fosfoglukonátdehydrogenázu (6-PGDH), fosfoglukomutázu (PGM), malátdehydrogenázu (MDH), leucinaminopeptidázu (LAP), aspartátaminotransferázu syn. glutamátaloacetáttransferázu (AAT syn. GOT) a fosfogluoizomerázu (PGI) (tab. 3). Bylo použito modifikovaných postupů isoenzymové extrakce, elektroforézy a barvicích postupů podle PASTEURA et al. (1988).

Tab. 3 – Přehled sledovaných enzymatických lokusů borovice lesní

Enzym	Zkratka	Lokusy enzymatického systému dle HERTELA (1997)
glukózo-6-fosfátdehydrogenáza	G-6-PDH	(A)
šikimátdehydrogenáza	SDH	A, B
6-fosfoglukonátdehydrogenáza	6-PGDH	B
Fosfoglukomutáza	PGM	A
malátdehydrogenáza	MDH	B, C
leucinaminopeptidáza	LAP	B
fosfogluoizomeráza	PGI	B

Zymogramy byly vyhodnoceny z hlediska identifikace jednotlivých klonů na základě shody či rozdílu mezi zastoupením jednotlivých genetických variant enzymů, resp. lokusů (alel). Zjištěné genotypy byly označeny číselnými kombinacemi alel v pořadí vzrůstající pohyblivosti v elektrickém poli (0), 1, 2, 3 jako alelické páry (např. 12, 22, 23 atd.). Vedle vlastního vyhodnocení a přiřazení alelických párů byly vypočteny hodnoty alelických frekvencí (relativní zastoupení zjištěných alel) a heterozygotnosti (relativní zastoupení heterozygotních jedinců).

Pro alelické páry vybraných lokusů byly vypočteny a porovnány jejich alelické kombinace a byl vyhodnocen Rao index kvadratické entropie R jako kritérium genetické diverzity (BOTTA et DUKÁT 2005). Výsledky byly vyhodnoceny a porovnány s využitím speciálního software IsoEnz a SeQan firmy IDS <http://www.infodatasys.cz/>.

4.6. DNA analýzy

K výzkumným účelům byl použit rostlinný materiál ze semenného sadu č. 79 – Doubrava. Pro izolaci DNA byl použit izolační kit DNeasy Plant Mini Kit. DNA byla vyizolována z dormantních pupenů borovic, zpracovalo se 40 ramet od 5 klonů (č. 2102, 2366, 2984, 2991, 2994), navážka jednoho vzorku určeného pro izolaci byla přibližně 100 mg. Pupy byly rozdrobeny pomocí tekutého dusíku v třecích miskách. Dále se postupovalo dle protokolu izolačního kitu. Úspěšnost vyizolování DNA vzorků byla detekována po proběhlé elektroforéze na 0,8% agarózovém gelu. Agarózový gel se připravil navážením 1,6 g agarózy (Agarose SERVA for DNA), která byla ve 200 ml roztoku 0,5% TBE (Tris borate EDTA puf) při zahřívání rozpuštěna. Do vychladlého stále tekutého čirého roztoku byly přidány 3 μ l ethidium bromidu. Na gel v horizontální elektroforetické aparatuře se do slotu nanášelo 5 μ l vzorku vyizolované DNA a 5 μ l loading buffer (Sigma). Doba trvání elektroforézy byla 30 min při napětí 40 V a poté 90 minut při napětí 90 V. DNA byla vizualizována pomocí ethidium bromidu pod UV zářením. Vzorky vyizolované DNA se zamrazily na -20 °C.

Pro sledování genetické variability vzorků borovice lesní byla použita technika PCR-RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA – polymorfismus náhodně amplifikované DNA). Při této technice je použit jako primer krátký oligonukleotid o délce 10 nukleotidů s nahodilou sekvencí. Při této délce je značná pravděpodobnost, že v genomu bude mnoho míst homologních k použitému oligonukleotidu a některá z nich budou dostatečně blízko u sebe, aby v úseku mezi nimi při využití PCR docházelo k amplifikaci DNA. Výsledkem je velká skupina amplifikovaných fragmentů, které se pak rozdělí elektroforeticky. Genomy příbuzných, ale často i vzdálenějších druhů jsou velmi shodně organizovány. Většina proužků bývá shodná, proto je třeba vyhledat primer, který vykazuje různou polohu proužků i u velmi příbuzných organismů pro studium polymorfismu. Soubor několika takových primerů charakterizuje např. odrůdu velmi přesně (ČURN et SÁKOVÁ 1997). Pro borovici lesní byly testovány primery Operon Biotechnologie GmbH ze sad OPE a OPR pro vyhledání primerů ukazujících polymorfismus sledovaných klonů a potvrzujících totožnost ramet v rámci jednoho klonu. Při užití polymerázy Takary Taq (TAKARA Biotechnology, CO., LTD.) se amplifikační reakce pro jeden vzorek připravovala v objemu 25 μ l. RAPD reakce probíhala v termocykleru Perkin Elmer 2400 a Bioer XP cycler. Amplifikační produkty byly analyzovány elektroforézou na 1,5% agarózových gelech v 0,5% TBE pufru a vizualizovány pomocí ethidium bromidu pod UV zářením. Gely byly dokumentovány pomocí kamerového systému Discovery 10gD.

4.7. Návrh semenného sadu 1,5. generace

Návrh semenného sadu 1,5. generace vychází ze selekce na základě ověřování genetické homogenity klonů v semenném sadu 1. generace č. 79 – Doubrava s využitím genových markerů a kvalitativních genetických znaků potomstev těchto klonů na testovací výsadbě Skelná Huť. Selekce podle kvantitativních znaků nebyla systematicky uvažována vzhledem k tomu, že by došlo k nepřiměřeně velkému zúžení počtu klonů. K mortalitě a průměrným výškám klonů (resp. pořadí šlechtitelských hodnot) bylo pouze přihlédnuto. Větevnatost nebyla brána v úvahu (viz 4.2.), stejně jako hodnocení fenologie kvetení v SS č. 43 – Nepomuk-Silov (4.2.).

Základem selekce provedené pomocí genových markerů byly výsledky systematicky prováděných isoenzymových analýz a dále výsledky DNA analýz (v rámci projektu pouze pro vybraných 5 klonů). Vyřazeny byly všechny klony, u kterých byla jakoukoli z těchto molekulárně genetických metod zjištěna více než jedna odlišná rameta.

Jako hlavní faktor selekce na základě kvalitativních znaků bylo zvoleno % tvarově nepřijatelných jedinců jednotlivých potomstev klonů na testovací výsadbě Skelná Huť a jako vedlejší faktory průměrná mortalita těchto potomstev a průměrná výška (pořadí klonů dle šlechtitelských hodnot odvozených z naměřených výšek). Byla zvolena nevyvážená selekce zohledňující tyto znaky.

Návrh „semenného sadu 1,5. generace“ je realizován ve variantním řešení v tom smyslu, že se uvažuje jednak s genetickou probírkou, dále se selektivním sběrem osiva a konečně i se založením nové výsadby SS 1,5. generace v pravém slova smyslu.

5. VÝSLEDKY

5.1. Biometrická měření

Zjištěné hodnoty mortality klonů na lokalitách testovacích ploch Skelná Huť a Nepomuk jsou uvedeny v přílohách 7a a 8, mortalita jednotlivých ramet na ploše Skelná Huť pak v příloze 7b. Ve stejných přílohách je uvedeno rovněž hodnocení rostoucích jedinců z hlediska tvárnosti kmene (přiřazení k příslušným třídám tvárnosti označených písmeny – viz kapitolu 4.2.). Za tvarově přijatelné byli nakonec považováni všichni jedinci, kteří byli klasifikováni v rámci kombinace znaků N, Ja, Sa, za tvarově nepřijatelné pak jedinci klasifikovaní jako Jz, Sz, V nebo R.

Pokud jde o hodnocení výškového a tloušťkového růstu potomstev semenných sadů rostoucích na testovacích plochách, byly na pracovišti katedry dendrologie a šlechtění lesních dřevin FLD ČZU v Praze, které disponuje příslušným softwarem (ASReml), vypočteny šlechtitelské hodnoty a chyby odhadů těchto ukazatelů pro všechny klony jak pro testovací plochu Skelná Huť, tak pro lokalitu Nepomuk (přílohy 10a,b a 11a-d). Nižší spolehlivost odhadu šlechtitelských hodnot klonů je dána především počtem disponibilních jedinců těchto klonů na testovacích plochách. Rozdělení šlechtitelských hodnot ve výstupu ze software je centrováno kolem nuly. Průměr šlechtitelských hodnot není ve smyslu dalších šlechtitelských opatření významný, podstatný je rozptyl jejich rozdělení. Pro možnost srovnání klonů podle jejich klesající šlechtitelské hodnoty byla k vypočteným hodnotám připočtena konstanta, aby byly odstraněny záporné hodnoty. Tímto krokem nedochází k ovlivnění rozdílů mezi stromy v obecné kombinační schopnosti. Podstatné (ve smyslu genetické probírky) jsou rozdíly mezi hodnotami, ne absolutní hodnoty jako takové.

5.2. Fenologie kvetení

Podle výsledků fenologického pozorování provedeného v semenném sadu č. 43 – Nepomuk-Silov, uvedených v přílohách 9a a 9b (stav kvetení 5. 5. 2009 a 15. 5. 2009), je patrné, že převážná část klonů (resp. ramet) kvetla současně a teoreticky se tedy mohly „setkat“ a vzájemně opylit. Rychlý průběh kvetení v důsledku vývoje počasí v květnu měl za následek, že ve třetím termínu (25. 5. 2009) sledování jsme pouze mohli konstatovat, že vývoj kvetení u všech ramet je na stupni 5, což znamená, že veškerá samčí i samičí květenství u všech ramet jsou již odkvetlá. Z tohoto důvodu plánek z tohoto termínu neuvádíme.

5.3. Isoenzymové analýzy

Primárním experimentálním výstupem těchto analýz jsou zymogramy enzymatických systémů, které představují záznam isoenzymů rozdělených podle jejich vzájemně odlišné pohyblivosti v elektrickém poli při elektroforéze.

Vyhodnocení isoenzymových analýz 14 rodičovských stromů potvrdilo jejich příslušnost k deklarovanému klonu ve 13 případech. U rodičovského stromu označeného jako klon 2975 byl zjištěn rozdíl oproti rametám téhož označení klonu v sadu č. 79 – Doubrava (homogenní klon). Jednalo se o rozdíl v zastoupení alel u lokusu 6-PGDH-B. V případě

10 anonymizovaných rodičovských stromů se po jejich dodatečné identifikaci zadavatelem (viz odst. 4.4) ukázalo, že jednoznačně a správně byl přiřazen jedinec s označením F:

F: 20005

Jedinec B odpovídal dvěma možnostem:

B: 2101, 2993

Zbývající rodičovské stromy nebylo možné přiřadit vzhledem k tomu, že jejich alelické kombinace jsou ve sledovaném sadu zastoupeny velkým počtem (několika desítkami) klonů. Úloha dohledání a určení neznámých klonů je zpětná úloha, která je vždy podstatně obtížnější, než úloha přímá, tj. určení genotypových kombinací klonů předem známých. Je navíc komplikována nehomogenitou klonů, představující značné zvýšení počtu kombinací, ze kterých je třeba vybírat.

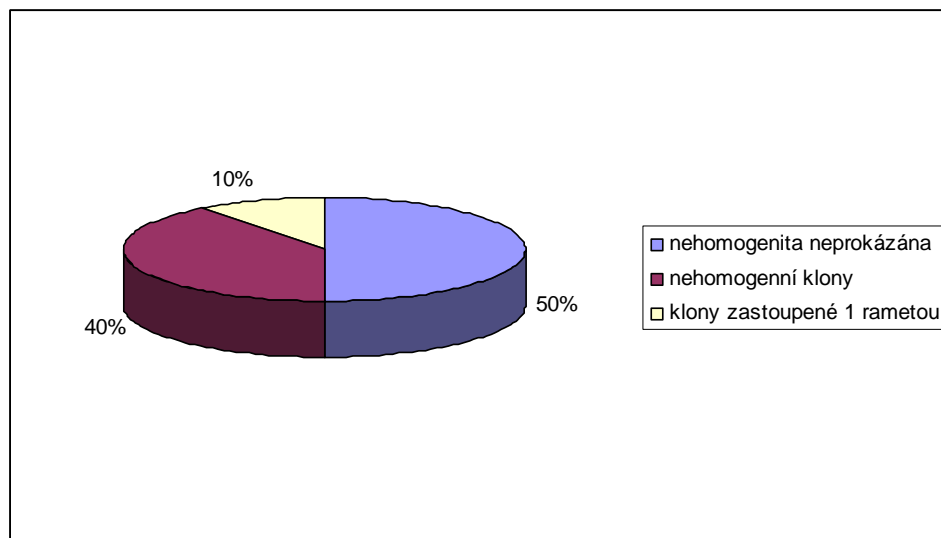
Orientační isoenzymové analýzy odebraných 16 vzorků podnoží ukázaly přítomnost pouhých 7 skupin genotypových kombinací, z nichž všechny byly již dříve identifikovány u klonů, resp. ramet v sadu. Rozdíly mezi podnožemi a rametami nebyly jednoznačně identifikovány.

Při genetickém screeningu sadu č. 79 – Doubrava bylo z celkového počtu hodnocených 86 klonů v letech 2008-09 shledáno geneticky nehomogenními 34 klonů; 72 klonů bylo zastoupeno více než třemi, 5 klonů dvěma a 9 klonů jednou rametou (tab. 4, obr. 3, viz barevné odlišení klonů s různým počtem měřených ramet v příloze 5a). Z celkového počtu vyhodnocených 345 ramet bylo zjištěno 38 geneticky odlišných (v rámci klonu) (tab. 4, obr. 4). V příloze 5b je uveden a vyznačen soupis klonů, u kterých byla zjištěna nehomogenita na základě isoenzymových analýz u více než 1 ramety (viz též kap. 4.4.). Jedná se o hlavní podklad k vyřazení klonů při zakládání sadu 1,5. generace.

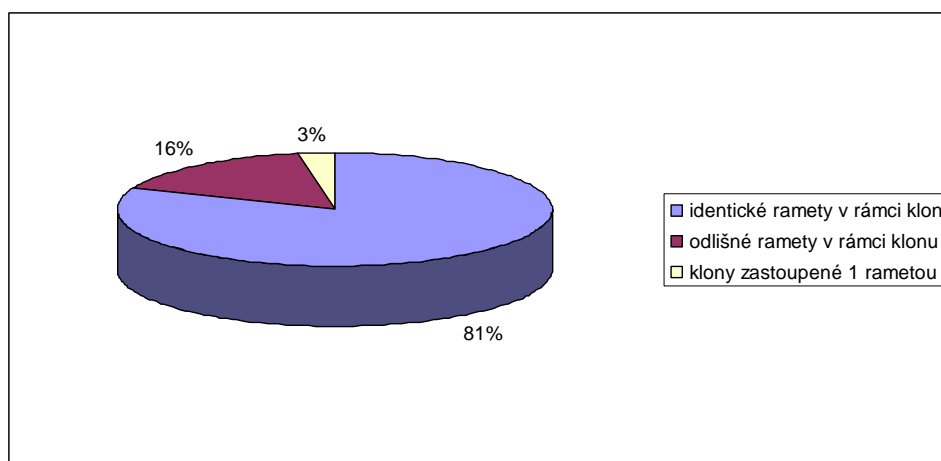
Poznámka: Značení ramet a klonů a jejich základní charakteristiky, uvedené v přílohách 5a,b navazují na značení v příloze 1.

Tab. 4 – Genetická homogenita klonů a identita vs. odlišnost ramet (v rámci klonů) v semenném sadu č. 79 – Doubrava

	Nehomogenita klonů neprokázána	Nehomogenní klony	Klony zastoupené 1 rametou
Počet klonů	43	34	9
Podíl klonů [%]	50	40	10
Počet ramet	279	57	9
Podíl ramet [%]	81	16	3



Obr. 3 – Genetická homogenita klonů (měření 2008-09)



Obr. 4 – Genetická identita a odlišnost ramet v rámci klonu (měření 2008-09)

Výsledky měření genetického screeningu jsou pro jednotlivé klony a ramety uvedeny v příloze č. 5a. Sledované lokusy jsou zastoupeny počtem alel a genotypů, jež vzrůstají v pořadí: 2/2 (SDH-B) < 3/3 (PGM-A) ~ 3/3 (MDH-A) ~ 3/3 (LAP-B) ~ 3/3 (PGI-B) < 3/4 (MDH-C) < 4/4 (6-PGDH-B) < 4/5 (SDH-A). Hodnoty heterozygotnosti sledovaných lokusů vzrůstají v pořadí 0,071 (SDH-B) < 0,077 (LAP-B) < 0,107 (PGI-B) < < 0,135 (MDH-A) < 0,171 (SDH-A) < 0,183 (PGM-A) < 0,366 (6-PGDH-B) < 0,432 (MDH-C). Hodnoty heterozygotnosti jsou uvedeny spolu s alelickými frekvencemi v tab. 5.

Tab. 5 – Hodnoty alelických frekvencí a heterozygotnosti zjištěné na základě genetického screeningu semenného sadu č. 79 – Doubrava

Alelické Frekvence	LOKUS							
	SDH-A	SDH-B	6-PGDH-B	PGM-A	MDH-A	MDH-C	LAP-B	PGI-B
alela 1	0,011	0,000	0,004	0,021	0,009	0,246	0,008	0,024
alela 2	0,088	0,923	0,284	0,908	0,922	0,743	0,962	0,946
alela 3	0,874	0,077	0,710	0,07	0,069	0,011	0,030	0,030
alela 4	0,026	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Heterozygotnost	0,171	0,071	0,366	0,183	0,135	0,432	0,077	0,107

Při genetickém mapování vybraných kvalitních klonů byly z celkového počtu hodnocených 3 klonů shledány geneticky nehomogenními 2 z nich, tj. klony č. 2991 a 2994. Z celkového počtu vyhodnocených 39 ramet byly zjištěny 2 geneticky odlišné ramety u klonu č. 2991 a 2 odlišné ramety u klonu č. 2994, a sice na základě rozdílů ve třech, resp. čtyřech lokusech (u obou uvedených klonů) (příloha č. 6).

Na základě výskytu alelických párů pro lokusy SDH-A, SDH-B, 6-PGDH-B, PGM-A, MDH-A, MDH-C a PGI-B bylo zjištěno 55 skupin různých alelických kombinací, zastoupených rozdílným počtem ramet. Jednalo se o skupiny v rozpětí 10 až 40 ramet. V prvním krajním případě se jednalo o jedinečné, navzájem odlišné alelické kombinace, ve druhém krajním případě o jednotnou, společnou alelickou kombinaci. V této souvislosti bylo zjištěno, že ramety vyznačující se genetickou odlišností v rámci deklarovaného klonu odpovídají ve většině případů méně rozšířeným nebo jedinečným genotypovým kombinacím. Například z celkového počtu 10 ramet s jedinečnou alelickou kombinací bylo zjištěno 6 ramet, vyznačujících se odlišností v rámci klonu.

Pro velké skupiny ramet s jednotnou alelickou kombinací, tj. pro skupiny klonů s nejmenším počtem vzájemných odlišností v tomto směru, byl proveden soupis odpovídajících klonů, jež tvoří 9 skupin různých alelických kombinací (tab. 6). Pozn.: Skupiny byly tímto způsobem vybrány proto, že odpovídají přibližně polovině souboru měřených klonů (41 klonů, tj. 48 %) a polovině souboru ramet, jejichž příslušnost ke klonu byla ověřena pomocí isoenzymových analýz (152 ramet, tj. 53 %).

Byla aktualizována hodnota Rao indexu kvadratické entropie $R = 0,122$ (BOTTA et DUKÁT 2005).

Tab. 6 – Soupis klonů 9 alelických kombinací s nejvyšším zastoupením v semenném sadu č. 79 – Doubrava

Počet ramet	Počet klonů	Klony*)										
		2369	2996	20004	2008	2099	2348	20007	20108	2357	2364	2997
40	11	2369	2996	20004	2008	2099	2348	20007	20108	2357	2364	2997
30	6	2984	20110	20011	2995	2998	20011					
22	7	20010	2988	2309	2979	20003	2010	2779				
11	3	2360	2366	2377								
12	4	2653	20112	2103	2990							
12	2	2980	2985									
10	4	2976	2358	2365	2776							
7	2	2986	2994									
8	2	2373	2983									

*) pro lokusy: SDH-A, SDH-B, 6-PGDH-B, PGM-A, MDH-A, MDH-C a PGI-B

5.4. DNA analýzy

Polymorfní amplifikační produkty, tj. profily namnožených úseků DNA pro jednotlivé klony byly získány s využitím primerů OPE 13, OPR 08, OPR 04. Vyhodnocení RAPD profilů bylo provedeno pomocí specializovaného softwaru UltraQuant. Profily proužků (bandů) byly variabilní mezi sledovanými klony borovice, ale byly zjištěny i genetické rozdíly mezi několika rametami stejného klonu. Tabulka 7 uvádí, u kterých ramet od jednotlivých klonů byly profily proužků shodné a u kterých se lišily v souvislosti s typem primeru. Tabulka 8 pak dokumentuje srovnání s výsledky analýz isoenzymů, provedených v letech 2008-2009.

Tab. 7 – Výsledky DNA analýz vybraných klonů pro primery OPE 13, OPR 08, OPR 04

Klon 2994	Primer OPE 13	Primer OPR 08	Primer OPR 04
Ramety			
5	-	-	-
37	-	-	-
44	-	-	-
65	x	x	x
70	-	-	-
87	x	x	x
92	-	-	x
128	-	-	-
133	x	x	x
164	-	-	-
Klon 2991			
Ramety			
20	-	-	-
24	-	x	-
26	-	x	x
64	-	-	-
69	-	-	-
73	-	-	-
97	-	x	x
100	x	x	-
125	-	-	-
127	-	-	-
Klon 2102			

Ramety			
174	-	-	-
188	-	-	-
189	-	-	-
207	-	-	-
220	-	-	-
228	-	-	-
243	x	-	-
265	x	-	-
Klon 2366			
Ramety			
9	-	-	-
27	-	-	-
53	-	-	-
143	-	-	-
224	x	-	-
Klon 2984			
Ramety			
1	-	-	-
52	-	-	-
80	-	-	-
109	x	-	-
142	-	-	-

- shodný profil proužků v rámci klonu
x odlišný profil proužků v rámci klonu

Tab. 8 – Srovnání výsledků DNA a isoenzymových analýz (tučně zvýrazněny případy shody obou metod)

Klon	Ramety odlišné v rámci klonu podle analýz:	
	DNA / RAPD	isoenzymů
2994	V12, L17, E18 , U26	L17, E18
2991	K4 , C5, S18, M19	C2, K4
2102	B52, I56	-
2366	A49	A3
2984	J22	L15

Tabulka 8 ukazuje, že pomocí analýz zvolených DNA primerů bylo v rámci vybraných klonů a roubovanců identifikováno 12 odlišných ramet u všech 5 sledovaných klonů; pomocí zvolených isoenzymových lokusů bylo identifikováno 6 odlišných ramet u 4 klonů. Ve 3 případech byly oběma metodami vylišeny totožné ramety. V příloze 5b je uveden a vyznačen soupis klonů, u kterých byla zjištěna nehomogenita na základě DNA analýz u více než 1 ramety. Jedná se o součást podkladu k vyřazení klonů při zakládání semenného sadu 1,5. generace.

5.5. Návrh semenného sadu 1,5. generace

Návrh semenného sadu 1,5. generace vychází ze selekce na základě mapování homogenity klonů v sadu č. 79 – Doubrava s využitím genových markerů a následně nevyvážené selekce

podle kvalitativních genetických znaků potomstev těchto klonů na testovací výsadbě Skelná huť. K selekci podle kvantitativních znaků (výška, resp. šlechtitelská hodnota na bázi výšky – příloha 10a) bylo přihlédnuto pouze okrajově. Klony byly vyřazovány postupně na základě následujících kritérií:

1. nehomogenita zjištěná pomocí genových markerů, tj. isoenzymových analýz (červená barva v tab. 9) a DNA analýz (žlutá barva). Tímto způsobem byly vyřazeny klony, u nichž byla zjištěn velký počet ramet (tj. 3-5) geneticky různorodých nebo odlišných od rodičovského stromu.
2. nehomogenita zjištěná pomocí DNA analýz (žlutá)
3. nepřijatelná tvárnost kmene – nevyvážená selekce se zastoupením 3 – 8 ramet / klon (oranžová)
4. průměrná mortalita – redukce počtu ramet / klon pro mortalitu > 50 %
5. průměrná výška – snížení počtu ramet o 1 jedince pro klony s průměrnou výškou < 600 cm (resp. s nízkou šlechtitelskou hodnotou – příloha 10a)

Výsledek uvedené selekce pro celkový počet 40 klonů a 240 ramet je znázorněn v tabulce 9.

Tabulka 9 – Odvození návrhového počtu ramet pro 40klonový SS 1,5. generace

Klon	Tvar	Mort.	Výška	Stávající počet ramet	Návrhový počet ramet
20007	42,9	76,7			
2372	37,5	80,0			
2978	35,0	53,8			
2373	33,3	70,0			
2103	30,0	66,7			
2357	30,0	50,0			
20111	28,6	65,0			
2988	27,0	38,3			
2379	26,7	40,0			
2656	26,3	52,5			
2976	25,0	50,0			
2989	25,0	86,7			
2979	23,1	56,7			
20008	22,7	68,6			
20107	22,5	20,0			
2363	22,4	42,0			
2776	22,2	55,0			
2996	22,2	55,0			
20004	22,0	34,4			
2099	21,6	35,3			
2992	21,6	53,8	603	4	4
20010	21,6	49,0	579	5	5
2990	21,1	49,3	597	5	5
2998	19,4	55,0	614	4	4
2097	19,2	65,3			
20011	18,6	34,4	608	5	5
2986	18,4	52,5	584	4	4
2352	18,4	55,5			
20001	18,2	63,3	576	3	4
20012	18,1	40,0	591	4	5
2365	17,6	43,3	648	2	6

*Projekt Grantové služby LČR
Zakládání semenných sadů druhé generace pro borovici lesní.*

2098	17,5	43,0	650	5	6
2002	16,7	60,0	592	2	5
20109	16,7	40,0	639	1	6
2350	14,3	65,0	555	1	5
2984	14,3	30,0			
2658	14,0	36,7	682	5	6
20112	13,8	42,0	627	5	6
2374	13,2	24,0	573	5	5
2355	13,0	71,3			
2980	12,8	61,0	630	5	5
2101	12,8	47,8			
2377	12,5	60,0	674	2	5
2981	12,5	46,7			
2993	12,5	20,0			
20003	12,3	36,7	602	5	7
2991	12,2	18,0			
2349	11,9	16,0	672	5	7
2983	11,5	35,0	576	4	7
2361	11,1	55,0	689	2	6
2657	11,1	46,0			
2995	11,1	28,0	664	5	7
2375	10,7	68,9			
2994	10,5	28,8			
2360	10,5	30,0	660	5	7
2997	10,4	40,0	600	4	7
20108	10,2	26,7	603	4	7
20110	10,0	50,0	647	1	7
2371	9,4	47,0			
20005	8,6	19,0			
20002	8,3	32,5	650	6	7
2982	8,0	41,3	646	5	7
2655	7,9	21,3	617	4	7
2985	7,9	30,0	607	10	7
2659	6,8	41,0			
2987	6,6	35,0	638	5	7
2653	5,6	55,0	611	2	6
2369	5,5	45,0	601	5	7
2975	5,0	60,0			
2654	4,5	51,1	631	5	6
2356	3,8	22,0	612	5	7
2353	3,3	40,0			
2351	3,1	36,0			
20006	2,2	42,5			
2102	1,3	23,0			
2358	0,0	70,0	721	2	6
2364	0,0	25,0	568	1	7
2366	0,0	18,0			
2378	0,0	70,0	628	1	6
2918	0,0	50,0	579	1	7
				154	240

Průměrné výšky byly vypočteny v rámci přípravy publikace (KAŇÁK, KLÁPŠTĚ ET LSTIBŮREK 2009). Hodnoty mortality a průměrné výšky, ke kterým bylo při výběru klonů pro semenný sad 1,5. generace přihlíženo, jsou v tabulce 9 označeny červeně. Vzhledem k tomu, že dynamika růstu potomstev je individuální podle ontogenetického stáří a stanoviště, sloužil tento ukazatel při výběru jen jako pomocné kritérium.

Fenologické šetření SS č. 43 – Nepomuk-Silov nebylo vzhledem k zjištěným výsledkům i jejich možnému zkreslení (mimořádně krátké trvání jednotlivých fenologických fází v daném roce pozorování, údaje pouze z jednoho roku) do návrhu genetické probírky ani návrhu semenného sadu 1,5. generace promítnuto.

Převodu SS 1. generace na "1,5. generaci" lze docílit několika způsoby:

- Selektivní sběr (příloha 12a). Klony SS 1. generace č. 79 – Doubrava, které nebyly z návrhu pro 1,5. generaci vyloučeny analýzami genových markerů, ani na základě nevyhovující tvárnosti kmene, mohou být předmětem tzv. selektivního sběru. Takto bylo vybráno 40 nejlepších klonů, které jsou reprezentovány 154 rametami (viz tab. 9). Bude-li reprodukční materiál těchto klonů ve stávajícím SS 1. generace sbírán separovaně, lze na něj pohlížet, jakoby se jednalo o materiál ze SS 1,5. generace.
- Genetická probírka (přílohy 12b-12d). Jedná se o způsob, kdy jsou ve stávajícím SS 1. generace nevhodné klony fyzicky odstraněny. Tento způsob převodu na 1,5. generaci je předložen ve třech variantních řešeních. První varianta (příloha 12b) představuje odstranění ramet, jejichž odlišnost v rámci klonu byla zjištěna pomocí analýz genových markerů. Druhá varianta (příloha 12c) představuje řešení, kdy jsou klony vyřazeny na základě nepřijatelné tvárnosti. Třetí varianta (příloha 12d) pak představuje kombinaci obou předchozích způsobů.
- Návrh nového semenného 1,5. generace (příloha 12e). Pro toto řešení je uvažováno 40 nejlepších klonů (dtto varianta selektivního sběru). Na základě provedené nevyvážené selekce, kdy bylo přihlídnuto k mortalitě klonů a šlechtitelským hodnotám na bázi výškového růstu klonů, byl stanoven návrhový počet ramet příslušných elitních klonů (tab. 9). Je třeba doporučit přednostní odběr ramet z ortet (dle dřívější terminologie: výběrových stromů). Nejsou-li k dispozici, je možné použít odběr z ramet v semenném sadu.

Vlastní selekci, spojenou s převodem sadu 1. generace na 1,5. generaci lze uskutečnit více způsoby, například vyřazením klonů, jejichž šlechtitelská hodnota leží pod lineární oblastí funkce, vyjadřující její závislost na pořadí klonů (srov. přílohu 10a,b). Tento způsob je v obecném vyjádření použit v "Metodice zakládání semenných sadů 1,5 generace", která je výstupem řešeného projektu.

6. DISKUSE

Pokud se se semennými sady pracuje v rámci šlechtitelských programů, je velmi žádoucí až nezbytné provést ověření genetické identity používaného rostlinného materiálu. Pro identifikaci tohoto materiálu je potřeba zjistit, zda (1) každý jedinec má genotyp odpovídající jeho deklarované identitě a zda (2) je jeho genotyp shodný s genotypem ostatních jedinců, příslušejících k danému klonu. Aby byli dva jedinci považováni za ramety jednoho klonu, musí být jejich genotypy identické, což přísně vzato by vyžadovalo znalost kompletního genomu. Avšak ani kompletní shoda dvou jedinců ve všech sledovaných genových lokusech nemůže úplně zaručit, že patří ke stejnému klonu. Statisticky lze pouze kvantifikovat pravděpodobnost, že oba jedinci „s vysokou pravděpodobností přísluší ke stejnému klonu“. Naopak, pokud se dva jedinci neshodují byť v jediném lokusu, lze s jistotou vyloučit jejich příslušnost ke stejnému klonu (CHELIAK et PITEL 1984).

Z výsledků isoenzymových analýz uvedených v tabulce 4 a na obrázcích 3 a 4 vyplývá, že většina klonů borovice lesní je geneticky jednotná, tj. ramety odpovídají ve většině případů danému klonu. Všechny hodnocené isoenzymové lokusy byly polymorfní, odpovídající vyšším než 5% hodnotám heterozygotnosti. Ze sledovaných 86 klonů, reprezentujících 99 % celkového počtu klonů v sadu, bylo zjištěno 34 geneticky nehomogenních klonů, což odpovídá 40 % sledovaných klonů. Ze sledovaných 345 ramet, reprezentujících 29 % celkového počtu ramet v sadu bylo zjištěno 57 geneticky odlišných (v rámci klonu), což odpovídá 16 % sledovaných ramet. Rozšíření genetického monitoringu o další ramety vedlo ve srovnání s měřením v r. 2008 ke zjištění dalších 9 nehomogenních klonů, zastoupení geneticky odlišných ramet se však snížilo o 2 % (IVANEK et al. 2008). To je dáno tím, že s rostoucím množstvím sledovaných ramet / klon lze ve větším počtu případů a s vyšší pravděpodobností vylišit genotypovou kombinaci, charakterizující deklarovaný klon. Další zpřesnění homogenity klonů spočívá hlavně v rozsahu isoenzymových analýz.

Zjištěný podíl nehomogenních klonů v sadu č. 79 – Doubrava je podstatně nižší, než u semenných sadů borovice lesní a smrku ztepilého studovaných BRUCHÁNIKEM (2001). Je však srovnatelný např. s podílem nehomogenních klonů, zjištěným u semenného sadu borovice lesní Rudíkovy-Albrechtice (IVANEK et PROCHÁZKOVÁ 2008); v tomto směru jsou srovnatelné i hodnoty heterozygotnosti a alelických frekvencí většiny měřených lokusů.

Počet alelických kombinací je spolu s Rao indexem měřítkem genetické diverzity, přičemž jedinečné alelické kombinace odpovídají málo rozšířeným nebo nepůvodním jedincům. Této okolnosti nasvědčuje fakt, že z celkového počtu 10 ramet s jedinečnou alelickou kombinací bylo zjištěno 6 ramet, vyznačujících se odlišností v rámci klonu, ale i vysoký podíl tohoto typu ramet mezi skupinami s nejméně rozšířenými alelickými kombinacemi. Například 24 ramet se zjištěnou odlišností v rámci klonu, tj. 42 % z jejich celkového počtu v sadu č. 79 – Doubrava, přísluší alelickým kombinacím, které jsou zastoupeny pouze 1-5 jedinci. Velký výskyt jedinečných nebo vzácných alelických kombinací mezi rametami odlišnými v rámci klonu v tomto semenném sadu tedy nasvědčuje tomu, že tyto ramety pravděpodobně nepocházejí z reprodukčního materiálu místního původu.

Naopak rozšířený výskyt téže alelické kombinace u většího počtu klonů odpovídá jedincům s vysokým stupněm vzájemné příbuznosti nebo jedincům typickým pro původní populaci (IVANEK et MATĚJKA 2009). Klony s nejmenším počtem vzájemných genetických odlišností, vyznačující se velkými skupinami ramet s jednotnou alelickou kombinací (tab. 6), tedy

odpovídají klonům s nejvyšším stupněm příbuznosti. To dokumentuje skutečnost, že celá polovina klonů v sadu je tvořena pouze 9 různými skupinami alelických kombinací. Pozn.: Jedním z důsledků této skutečnosti je, že u těchto klonů je ztíženo vzájemné rozlišení a jejich jednoznačná identifikace při vzájemném srovnání.

Rao index diverzity $R = 0,112$, zjištěný v semenném sadu č. 79 – Doubrava, lze považovat za vysoký, porovnatelný s původními populacemi borovice lesní (IVANEK 2008). Vzhledem k tomu, že se však jedná o soubor pouhých 86 klonů není možné z dosavadních výsledků charakterizovat soubor populací v celém areálu PLO 6, ze které pochází většina klonů. Srovnání výsledků DNA / RAPD a isoenzymových analýz především ukazuje, že výskyt nehomogenních klonů ve sledovaném semenném sadu potvrzují obě metody. Skutečnost, že těmito metodami nebyly ve všech případech vylišeny totožné ramety je dána tím, že zvolené isoenzymové lokusy i DNA primery mapují různé části genomu sledované rostliny. Účinnost obou metod při identifikaci odlišných ramet v rámci nehomogenních klonů je srovnatelná. V sadu Doubrava bylo pomocí DNA analýz (3 primery) vylišeno 12 odlišných ramet a 5 nehomogenních klonů, zatímco pomocí isoenzymových analýz (5-8 lokusů) bylo vylišeno 6 odlišných ramet a 4 nehomogenní klony z celkového počtu 5 sledovaných. Při obdobném testování nehomogenity v semenném sadu BO Rudíkovy-Albrechtice (IVANEK et PROCHÁZKOVÁ 2008) byl naopak pomocí analýzy isoenzymů (8 lokusů) vylišen podstatně vyšší počet odlišných ramet ve srovnání s analýzami DNA (2 primery).

Pokud jde o sledování fenologických fází klonů (ramet) v semenných sadech, nebyla u nás analýza frekvence jejich kvetení a distribuce pylu dosud zkoumána. Podle zahraničních pramenů (např. MISIORNY et CHALUPKA 2006) se však podílí na opylení semenného sadu překvapivě pouze malá část klonů, resp. ramet, a to méně než 40 %.

Výsledky sledování fenologie kvetení uvedeného semenného sadu byly tedy ovlivněny průběhem počasí v první polovině roku 2009 a zřejmě i polohou semenného sadu, umístěného na svahu, v jehož spodní části je mrazová kotlina.

Zajímavé, ale logické, je, že vývoj kvetení u všech ramet téhož klonu byl téměř identický a nebyl ani příliš ovlivněn jejich polohou v sadu. Červená barva prašníků, která se ojediněle vyskytovala u některých klonů, by mohla sloužit jako potvrzení nebo vyvrácení příslušnosti ramety ke konkrétnímu klonu. Barva prašníků je samozřejmě geneticky podmíněná, stejně jako např. barva šišek (srv. *chlorocarpa*, *erythrocarpa*).

Z uvedených výsledků vyplývá, že téměř všechny ramety a tedy i klony se na jaře roku 2009 mohly zúčastnit opylování a plození. Nebylo tedy potvrzeno, že některé klony ve sledovaném semenném sadu by měly posunutou fenologii kvetení do takové míry, že by se s největší pravděpodobností při kvetení nesetkaly. Je však evidentní, že ve sledovaném období panovaly výjimečné klimatické podmínky, které s největší pravděpodobností tuto uniformitu kvetení vyprovokovaly.

Otázka větevnatosti nebo větvení je řešena na výsadbách např. ve Švédsku, kde je sledován úhel větví k ose kmínku a síla větví. Preferován je pravý až tupý úhel, penalizován je úhel ostrý. Měří se i síla (průměr) a počet větví v určitém přeslenu. Problém je v tom, že testovací výsadby jsou zde zakládány odlišným způsobem, především pokud jde o spon. Na rozdíl od našeho „provozního“ sponu $0,70 \times 1,40$ m je ve Švédsku používán spon až 3×3 m. Kultyry se tedy vyvíjí úplně jiným způsobem, samostatně a konkurence okolních stromků je do doby

jejich zapojení a hodnocení téměř vyloučena. V této souvislosti je nutno podotknout, že po konzultacích s tuzemskými specialisty na pěstování lesa (resp. borovice lesní) je použití tohoto sponu (3 × 3 m) možné např. na severu, ale ne u nás, vzhledem k naprosto odlišným růstovým podmínkám, které jsou dány jednak stanovištěm (zeměpisná šířka) a jednak odlišnými ekologickými vlastnostmi severských borovic, danými geneticky. Jestliže tedy ve Švédsku hodnotí úhel větví a jejich tloušťku, v podmínkách našich testovacích výsadeb to bohužel možné není. Úhel větví u jednoho stromu se liší na každém přeslenu a je ovlivňován zřejmě právě zápojem a vzájemnou kompeticí jedinců. U přeslenů starších je většinou úhel kolmý až tupý a směrem k vrcholu stromku se úhel zmenšuje. Mimoto se mění úhel větvení i u jednotlivých větvích v jednom přeslenu.

7. ZÁVĚR

V rámci hodnocení identity klonů u semenného sadu borovice lesní č. 79 – Doubrava pomocí isoenzymových analýz bylo ze sledovaných 86 klonů, reprezentujících 99 % celkového počtu klonů v sadu, zjištěno 34 geneticky nehomogenních klonů, což odpovídá 40 % sledovaných klonů. Ze sledovaných 345 ramet, reprezentujících 29 % celkového počtu ramet v sadu, jich bylo zjištěno 57 geneticky odlišných (v rámci klonu), což odpovídá 16 % sledovaných ramet. Byl zjištěn velký výskyt jedinečných nebo vzácných alelických kombinací mezi rametami odlišnými v rámci klonu v semenném sadu č. 79 – Doubrava, který nasvědčuje tomu, že tyto ramety pravděpodobně nepocházejí z reprodukčního materiálu místního původu. Na základě porovnání alelických kombinací byly dále vtypovány skupiny klonů s nejvyšším vzájemným stupněm příbuznosti.

Srovnání výsledků DNA a isoenzymových analýz ukázalo, že výskyt nehomogenních klonů ve sledovaném semenném sadu potvrzují obě metody. Skutečnost, že těmito metodami nebyly ve všech případech vylišeny totožné ramety, je dána tím, že zvolené isoenzymové lokusy i DNA primery mapují různé části genomu sledované rostliny. Účinnost obou metod při identifikaci odlišných ramet v rámci nehomogenních klonů je srovnatelná, jak potvrzuje srovnání s obdobným sledováním v semenném sadu BO Rudíkovy-Albrechtice (IVANEK et PROCHÁZKOVÁ 2008).

Vyhodnocení isoenzymových analýz 14 známých rodičovských stromů potvrdilo jejich příslušnost k deklarovanému klonu ve 13 případech. V případě 10 anonymizovaných rodičovských stromů byly odpovídajícím klonům jednoznačně přiřazeni 2 jedinci, další 2 jedinci odpovídali dvěma alternativním možnostem.

Výsledkem projektu je návrh převodu stávajícího semenného sadu 1. generace na semenný sad 1,5. generace. Tento převod byl vypracován v různých alternativách (selektovaný sběr osiva, genetická probírka, vlastní návrh SS 1,5. generace). Na základě provedeného biometrického šetření je možné tvrdit, že v daném semenném sadu bude mít genetická probírka, resp. separovaný sběr významný účinek na hodnotu genetického zisku. Založení nového SS 1,5. generace se jeví jako nejméně vhodná varianta (zejména ekonomický aspekt upřednostňuje v případě nové výsadby SS 2. generace). Jako optimální varianta z navržených

možností se jeví separovaný sběr osiva kvalitních klonů, přičemž zbývající méně kvalitní produkce je pro vlastníka rovněž určitým způsobem využitelná.

Obecný způsob převodu semenného sadu 1. generace na sad 1,5. generace je uveden v "Metodice zakládání semenných sadů 1,5 generace", která je výstupem řešeného projektu.

V návaznosti na sledování fenologie kvetení navrhuje, aby se (v rámci jiného projektu) pro vybrané perspektivní klony zopakovalo systematické fenologické sledování kvetení (fruktifikace). Vhodnější by byl semenný sad č. 79 – Doubrava (LS Plasy), jehož poloha, na rozdíl od hodnoceného semenného sadu č. 43 – Nepomuk, eliminuje mikroklimatické rozdíly stanoviště jednotlivých ramet, které by mohly nástup a průběh kvetení ovlivnit.

8. LITERATURA

- ANDERSSON, E., JANSSON, R., LINDGREN, D.: Some results from second generation crossing involving inbreeding in Norway spruce (*Picea abies*). *Silvae Genetica*, 23, 1974, s. 34-43.
- ANDERSSON, E. W., SÁNCHEZ RODRIGUEZ, L., ANDERSSON, B.: Group coancestry – controlled selection in *Pinus sylvestris* L. breeding program. *Theor. Appl. Genet.*, 99, 1999, s. 73-80.
- BELL, G. D., FLETCHER, A. M.: Computer organised orchards layouts (COOL) based on the permuted neighbourhood design concept. *Silvae Genetica*, 27, 1978, s. 223-225.
- BERGMANN, F., HATTEMER, H. H.: Isozyme loci and their allelic variation in *Pinus sylvestris* L. and *Pinus cembra* L. *Silvae Genetica*, 44, 1995, s. 286-289.
- BOTTA-DUKÁT, Z.: Rao's quadratic entropy as a measure of functional diversity based on multiple traits. *J. Veg. Sci.*, 16, 2005, s. 533-540.
- BRUCHÁNIK, R.: Šľachtiteľský program borovice lesnej pre pahorkatiny stredného Slovenska. *Dizertačná práca*. Banská Bystrica 2001. 113 s.
- BUIJTENEN, J. P. VAN: Seed orchard design, theory and practice. In: *Proceedings of the 11th Southern Forest Tree Improvement Conference*. 15.-16. June 1971, Atlanta, Georgia 1971.
- BURIÁNEK, V., IVANEK, O.: ABS of Forest Genetic resources in the Czech Republic. *Expert meeting on sectoral Aspects in the international ABS (Access and Benefit Sharing) Regime* Brussels, 15th September 2008. 2008.
- COCKERHAM, C.: Group inbreeding and coancestry. *Genetics*, 56, 1967, s. 89-104.
- ČURN, V., SÁKOVÁ, L.: Využití biochemických markerů ve šlechtění řepky a dalších brukvovitých plodin. *Genetika a šlechtění*, 33, 1997, s. 281-305.
- ERIKSSON, G., SCHELANDER, B., ÅKEBRAND, V.: Inbreeding depression in an old experimental plantation of *Picea abies*. *Hereditas*, 73, 1973, s. 185-194.
- GIERTYCH, M., MÁTYÁS, C. et al.: *Genetics of Scots pine*. Academia Kiado, Budapest 1991.
- GÖMÖRY, D., PAULE, L.: Inferences on mating system and genetic composition of a seed orchard crop in the European larch (*Larix decidua* Mill.). *Journal of Genetics and Breeding*, 46, 1992, č. 4, s. 309-313.
- HACKER, M., BERGMANN, F.: The proportion of hybrids in seed from a seed orchard composed of two larch species (*L. europaea* and *L. leptolepis*). *Annales-des-Sciences-Forestieres*, 48, 1991, č. 6, s. 631-640.
- HERTEL, H.: Biochemisch-genetische Untersuchungen bei Kiefer (*Pinus sylvestris* L.). *Mitteilungen der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft Hamburg*, Hamburg 1997.
- HYNEK, V., BURIÁNEK, V., BENEDÍKOVÁ, M., FRÝDL, J., KAŇÁK, J.: Výběrové stromy a porosty uznané pro sběr osiva: základní kritéria. VÚLHM, Jíloviště-Strnady 1997. 51 s.
- CHAKRAVARTY, G. N., BAGCHI, S. K.: A computer program for permuted neighbourhood seed orchard design. *Silvae Genetica*, 42, 1993, s. 1-5.

- CHELIAK, W. M., PITEL, J. A.: *Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species*. Petawawa National Forestry Inst., Canadian Forestry Service, Agriculture Canada 1984.
- IVANEK, O.: Genetické charakteristiky autochtonní populace borovice lesní Jeseníky - Suchý vrch na základě isoenzymových analýz (protokol o zkoušce č. 5/08 akreditované laboratoře č. 1175,3; IDO = 70). *Nepublikované výsledky*. 2008.
- IVANEK, O., FRÝDL, J., NOVOTNÝ, P., KAŇÁK, J.: Czech Republic, towards a seed orchards establishment and management, with especial attention to Scots pine problems. s. 12. In: TREEBREDEX Scots pine breeding workshop. *Sborník z workshopu*, Wageningen, The Netherlands, June 6, 2008. 16 s.
- IVANEK, O., MATĚJKA, K.: Genetic diversity and spatial structure of the selected young Norway spruce (*Picea abies*) population in the Giant Mts. In: 7th International conference Geoeological problems of the Karkonosze Mts. Szklarska Poreba, 21-23. 09. 2009.
- IVANEK, O., PROCHÁZKOVÁ, Z.: Identifikace roubovanců a klonů ve dvou semenných sadech modřínu opadavého (*Larix decidua* Mill.). *Zprávy lesnického výzkumu*, 51, 2006, č. 1, s. 38-43.
- IVANEK, O., PROCHÁZKOVÁ, Z.: Identifikace roubovanců a klonů v semenném sadu Rudíkovy-Albrechtice (výsledky připravené k publikaci). 2008.
- KANG, K. S., LINDGREN, D., MULLIN, T. J., CHOI, W. Y., HAN, S. U., KIM, C. S.: Genetic gain and diversity of seed crops under alternative management options in a clonal seed orchard of *Pinus thunbergii*. In: *Proceedings of the 28th Southern Forest Tree Improvement Conference in Releigh, NC* 21.-23. June 2005, hosted by North Carolina State University. 2005.
- KAŇÁK, J., KLÁPŠTĚ, J., LSTIBŮREK M.: Úvodní genetické hodnocení semenných sadů borovice lesní v západních Čechách. *Zprávy lesnického výzkumu*, 54, 2009, č. 3 (in print).
- KAŇÁK, K.: Genetické ověření smrkových porostů uznaných ke sběru osiva v Krkonoších. Závěrečná zpráva za období 1997-1999.
- KLÁPŠTĚ, J.: Návrh šlechtitelského programu pro posázavský smrk. *Dizertační práce*. FLD ČZU, Praha 2008. 128 s., CD-ROM.
- LINDGREN, D., GEA, L. D., JEFFERSON, P. A.: Status number for measuring genetic diversity. *Forest Genet.*, 1997, č. 4, s. 69-76.
- LINDGREN, D., MATHESON, A. C.: An algorithm for increasing the genetic quality of seed from seed orchards by using the better clones in higher proportions. *Silvae Genetica*, 35, 1986, s. 173-177.
- LINDGREN, D., MULLIN, T. J.: Balancing gain and relatedness in selection. *Silvae Genetica*, 46, 1997, s. 124-129.
- LSTIBŮREK, M., EL-KASSABY, Y. A.: Advanced generations minimum-inbreeding seed orchard design. *Forest Science*, 2008.
- MAGURRAN, A. E.: *Measuring biological diversity*. Blackwell Publishing, Malden (MA) 2004. 256 s.
- MALECOT, G.: *Les Mathématiques de l'Hérédité*. Masson et Cie, Paris 1948.
- MISIORNY, A., CHALUPKA, W.: Flowering and cone bearing of *Picea abies* grafts in second-generation seed orchards. *Dendrobiology*, 56, 2006, s. 51-59.
- NAMKOONG, G.: *Tree breeding: Principles and strategies*. Springer-Verlag, New York 1988.
- NÁROVCOVÁ, J., NÁROVEC, V., ČERMÁK, M.: Netvárnost borovice lesní v nejmladších kulturách. *Lesnická práce*, 83, 2004, č. 8, s. 420-421.
- OLSSON, T., LINDGREN, D., LI, B.: Balancing genetic gain and relatedness in seed orchards. *Silvae Genetica*, 50, 2001, s. 222-227.
- PASTEUR, N., PASTEUR, G., BONHOMME, F., CATALAN, J., BRITTON-DAVIDIAN, J.: *Practical Isozyme Genetics – Ellis Horwood series in gene technology*. Wiley & Sons, New York 1988.
- PAULE, L.: *Genetika a šľachtenie lesných drevín*. Bratislava, Príroda 1992. 304 s.
- PROCHÁZKOVÁ, Z., IVANEK, O., BEZDĚČKOVÁ, L., CVRČKOVÁ, H., KOLÁŘOVÁ, P., MÁCHOVÁ, P.: Fyziologická a genetická kvalita semen modřínu opadavého a borovice lesní ze semenných sadů. *Závěrečná zpráva projektu NAZV QD 0174*. VŮLHM, Strnady 2004.
- ROSVALL, O.: *Enhancing gain from long-term forest tree breeding while conserving genetic diversity*. Doctor's dissertation. Swedish University of Agricultural Sciences. 1999.
- SKRØPPA, T.: Diallel crosses in Norway spruce II. Performance and inbreeding depression of selfed families. *Forest Genetics*, 3, 1996, s. 69-79.

- ŠINDELÁŘ, J.: Základní principy šlechtitelských programů pro hospodářsky významné lesní dřeviny jehličnaté. *Lesnický průvodce*, 1992, č. 1, 78 s., přílohy.
- ŠINDELÁŘ, J., VAŠÍČEK, J., SKALICKÝ, V.: Produkce osiva v semenných sadech borovice lesní a modřínu opadavého v České socialistické republice. *Lesnická práce*, 68, 1989, č. 5, s. 207-215.
- TRÖBER, U., HAASEMANN, W.: Pollination effects in a larch hybrid seed orchard. *Forest Genetics*, 7, 2000, č. 1, s. 77-82.
- Vyhláška MZe ČR č. 29/2004 Sb., kterou se provádí zákon č. 149/2003 Sb., o obchodu s reprodukčním materiálem lesních dřevin. *Sbírka zákonů Česká republika*, 2004, č. 9, s. 467-524.
- Příloha č. 26 k vyhlášce č. 29/2004 Sb., odst. 3
- Zákon č. 149/2003 Sb., o uvádění do oběhu reprodukčního materiálu lesních dřevin lesnický významných druhů a umělých kříženců, určeného k obnově lesa a k zalesňování, a o změně některých souvisejících zákonů (zákon o obchodu s reprodukčním materiálem lesních dřevin). *Sbírka zákonů Česká republika*, 2003, č. 57, s. 3279-3294.
- ZHENG, Y. Q., LINDGREN, D., ROSVALL, O., WESTIN, J.: Combining genetic gain and diversity by considering average coancestry in clonal selection of Norway spruce. *Theor. Appl. Genet.*, 95, 1997, s. 1312-1319.

9. PŘÍLOHY

- 1 - Semenný sad borovice lesní č. 79 - Doubrava, LS Plasy, založen r. 1980 (stav výsadby k 31. 12. 2007), odběr v r. 2008 a 2009
- 2 - Semenný sad borovice lesní č. 43 - Nepomuk-Silov, LS Klatovy, založen r. 1975
- 3 - Testovací plocha Skelná Huť – rozmístění potomstev klonů a ramet
- 4 - Testovací plocha Nepomuk – rozmístění potomstev klonů
- 5a - Výsledky genetického screeningu semenného sadu č. 79 – Doubrava za r. 2008-2009 pomocí isoenzymových analýz
- 5b - Soupis klonů v semenném sadu č. 79 - Doubrava, LS Plasy, vyřazených při zakládání sadu 1,5. generace
- 6 - Výsledky genetického mapování vybraných klonů v semenném sadu č. 79 – Doubrava za r. 2008-2009 pomocí isoenzymových analýz
- 7a - Mortalita a podíl rostoucích jedinců jednotlivých klonů borovice lesní na testovací ploše Skelná Huť
- 7b - Mortalita a podíl rostoucích jedinců jednotlivých ramet borovice lesní na testovací ploše Skelná Huť
- 8 - Mortalita a podíl rostoucích jedinců jednotlivých klonů borovice lesní na testovací ploše Nepomuk
- 9a - Fenologie kvetení v semenném sadu č. 43 - Silov u Nepomuku, LS Klatovy (stav k 5.-7. 5. 2009)
- 9b - Fenologie kvetení v semenném sadu č. 43 - Silov u Nepomuku, LS Klatovy (stav k 15. 5. 2009)
- 10a - Šlechtitelské hodnoty klonů podle dosažených výšek a výčetních tloušťek na testovací ploše Skelná Huť
- 10b - Šlechtitelské hodnoty klonů podle dosažených výšek a výčetních tloušťek na testovací ploše Nepomuk
- 11a - Seřazení klonů podle klesajících šlechtitelských hodnot výšek na testovací ploše Skelná Huť
- 11b - Seřazení klonů podle klesajících šlechtitelských hodnot výčetních tloušťek na testovací ploše Skelná Huť
- 11c - Seřazení klonů podle klesajících šlechtitelských hodnot výšek na testovací ploše Nepomuk
- 11d - Seřazení klonů podle klesajících šlechtitelských hodnot výčetních tloušťek na testovací ploše Nepomuk

- 12a - Návrh selektivního sběru v SS č. 79 – Doubrava, LS Plasy, odpovídajícího semennému sadu 1,5. generace*
- 12b - Alternativní podoba genetické probírky v SS č. 79 – Doubrava, LS Plasy na základě výsledků molekulárních analýz*
- 12c - Alternativní podoba genetické probírky v SS č. 79 – Doubrava, LS Plasy na základě výsledků fenotypového šetření tvárnosti*
- 12d - Alternativní podoba genetické probírky v SS č. 79 – Doubrava, LS Plasy na základě kombinace výsledků molekulárních analýz a fenotypového šetření tvárnosti*
- 12e - Návrh semenného sadu 1,5. generace č. 79 – Doubrava, LS Plasy*
- 13 - Realizační výstup RV 1: Metodika zakládání semenných sadů 1,5. generace*