

KAKOVOSTNO SEME – KAKOVOSTNI PROIZVODI

Quality seed – quality products

*Povzetek: Semena v svojih genih prenašajo potencial dreves, ki se bodo iz njih razvila. Pri naravni obnovi narava sama izloči seme s slabim genotipom, medtem ko je pri umetni obnovi ta odgovornost v rokah gozdarjev. Tradicionalne teste kakovosti semena lahko danes dopolnimo s tistimi, ki temeljijo na poznavanju dedne zasnove semena, saj postaja genetska pestrost znotraj semenskih sestojev vse bolj pomembna pri oceni kakovosti le-tega. V prispevku so opisane metode, ki temeljijo na analizi molekularnih označevalcev in omogočajo oceno genetske pestrosti v semenskih sestojih, določanje števila osebkov, s katerih je bilo seme nabrano in potrjevanje izvora gozdnega reprodukcijskega materiala. Z opisanimi metodami smo analizirali devet podvzorcev semena in odraslih osebkov iz štirih semenskih sestojev smreke (*Picea abies* L. (Karst.)). Opisane metode imajo velik uporabni pomen pri zagotavljanju kakovosti semena za uporabo v gozdarstvu.*

Gljučne besede: dodeljevanje osebkov, genetska pestrost, kakovost semena, molekularne metode, navadna smreka, semenski sestoji, verjetnost identitete

*Abstract: Seeds carry in their genes the potential of newly developing trees. In the process of natural regeneration natural processes exclude the seed with unfavourable genotype, while with artificial regeneration this responsibility is in the hands of foresters. Today, traditional seed quality tests can be complemented with molecular ones as genetic diversity within seed stands is becoming increasingly important for assessment of seed quality. Methods, based on the analysis of molecular markers that enable analysis of genetic diversity within seed stands, number of parents, from which the seed has been collected and confirmation of origin of the forest reproductive material are presented. Nine subsamples of seed and adult trees from four Norway spruce (*Picea abies* L. (Karst.)) seed stands were analysed with the described methods. The described methods are of great importance for assuring high quality of seed for the use in forestry.*

Keywords: assignment methods, genetic diversity, seed quality, molecular methods, Norway spruce, seed stand, probability of identity

UVOD

V semenu je shranjena zasnova bodočih gozdov. Semena v svojih genih prenašajo potencial dreves, ki se bodo iz njih razvila. Seme s slabim genotipom bo vir neuspešnih potomcev, saj z naravno obnovo procesi selekcije izločijo osebkke, ki niso viabilni ali dovolj vitalni, da bi preživel v danem okolju. Tako poskrbi za kvalitetno genetsko zasnovo bodočega sestoja. Kjer naravna obnova ni možna, je

nujno, da za umetno obnovo uporabimo kakovosten in okolju prilagojen gozdni reprodukcijski material (GRM). S tem kar najbolj omejimo negotovosti pri osnovanju novih sestojev ter tako prihranimo čas in zmanjšamo stroške. Naravna obnova je ponavadi problematična po ujmah, v monokulturah, pri premenah monokultur v bolj naravne sestoje, idr. V zadnjem desetletju je umetna obnova v Sloveniji prisotna na površini med 450 in 750 ha letno (Poročilo Zavoda za gozdove Slovenije, 2009).

Da je seme res kakovostno in prilagojeno okolju, poskušamo zagotoviti že s samim načinom izbire semenskih sestojev, določili o najmanjšem številu dreves, s katerih seme nabiramo, s pravilno dodelavo semena in z vzgojo sadik. Pri vseh postopkih posvečamo veliko pozornosti

Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, SI-1000 Ljubljana, Slovenija,
e-pošta: marjana.pucko@gozdis.si

[†] ASP Teisendorf, Forstamtplatz 1, 83317 Teisendorf, Nemčija

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire, Večna pot 83, SI-1000 Ljubljana, Slovenija

sledljivosti GRM od sestoja do njegove ponovne vrnitve v gozd (Kraigher in Grecs, 2004)

Vendar je pri visokih vložkih v umetno obnovo potrebno objektivno preveriti, ali je seme zares kakovostno. Semenarski del preverjanja kakovosti je ustaljena praksa in obsega testiranje kalivosti ali test s tetrazolom, določanje teže 1000 semen, oceno čistosti semena, izračun vsebnosti vlage in oceno zdravstvenega stanja semen (ISTA, 2004). V zadnjih petnajstih letih pa je postala genetska pestrost znotraj semenskega sestoja ključni kriterij za oceno kakovosti GRM (Geburek in Heinze, 1998). V semenskih sestojih naj bi bila višja ali vsaj enaka povprečni genetski pestrosti ostalih sestojev iste drevesne vrste. V sestojih z visoko genetsko pestrostjo se namreč skriva potencial, ki v spreminjajočem se okolju omogoča preživetje, prilagajanje in uspevanje populacij. Genetsko pestrost lahko ocenimo z uporabo različnih molekularskih označevalcev in jo primerjamo s tisto v drugih sestojih.

Priporočila, zapisana v evropskih direktivah in slovenski zakonodaji, spodbujajo uporabo lokalnega GRM, saj je ta najboljše prilagojen okolju, v katerem raste, če s provenienčnimi testi ni ugotovljeno drugače.

Cilj prispevka je na primeru navadne smreke (*Picea abies* L. (Karst.)) predstaviti in oceniti metode, s katerimi lahko objektivno določimo kakovost GRM in potrdimo njegov izvor. To so metode, ki omogočajo oceno genetske variabilnosti, preverjanje števila dreves, s katerih je bilo seme nabrano in metode, s katerimi lahko potrdimo izvor partije semena.

MATERIAL IN METODE

RASTLINSKI MATERIAL IN IZOLACIJA DNK

V analizo smo vključili štiri semenske sestoje navadne smreke (*Picea abies* L. (Karst.): Pevc, Hrušica, Jerebikovec in Konačnik (Preglednica 1). Analizirali smo vzorce odraslih dreves, referenčnih vzorcev in vzorec iz partije nabranega semena. Oznaka »referenčni« vzorec pomeni, da smo za izolacijo DNK uporabili vzorec, ki ga je po zakonu dolžna odgovorna strokovna oseba dobavitelja dnevno posredovati pooblaščenim osebam za nadzor (Gozdarski inštitut Slovenije - GIS). Za vrste iz rodu *Picea* predstavlja referenčni vzorec en storž za vsako drevo, s katerega se seme nabira. Iz vsakega storža smo izluščili seme. Za kalitev smo naključno izbrali pet semen iz celotnega nabora, izmed skaljenih

pa potem naključno še eno klico, iz katere smo izolirali DNK. V »partiji semena« je zmešano vse seme, nabrano v istem semenskem sestoju. Iz vsake izmed treh partij smo naključno izbrali 30 semen, jih skalili in iz klic izolirali DNK. Za vsako partijo semena smo analizirali tudi kalivost po standardnem postopku (ISTA, 2004). Z namenom testiranja uporabnosti postopka izolacije DNK smo DNK izolirali tudi iz s škrobom bogatega megagametofita, to je tkiva, ki ima maternalni izvor.

DNK smo izolirali iz semena oziroma kalčkov ali megagametofita s pomočjo predpripravljenega postopka »DNeasy Plant Mini Kit« (Quiagen) iz skupno 230 semen ali odraslih dreves navadne smreke ter iz 24 megagametofitov (seme iz sestoja Pevc; ni prikazano v preglednici 1).

Kvaliteto in količino izolirane genomske DNK smo preverili na 0,8 % agaroznem gelu z gelsko elektroforezo.

ANALIZA MIKROSATELITOV

Izolirano DNK smo pomnožili v verižni reakciji s polimerazo (PCR) s sedmimi pari začetnih oligonukleotidov, v ločenih reakcijah za vsak par. Začetni oligonukleotidi označujejo sedem mikrosatelitnih lokusov jedrnega genoma: SpAGG3 (Pfeiffer in sod., 1997), EAC1F04 in EAC1G5 (Scotti in sod., 2002), PAAC3 in PAAC19 (Scotti in sod., 2000), paGB8 (Besnard in sod., 2003) in PGL15 (Rajora in sod., 2001). Reakcijska mešanica PCR v skupnem volumnu 10 μ l je vsebovala 1 x PCR pufra; 0,2 μ M vsakega začetnega oligonukleotida; 0,2 mM vsakega izmed štirih dNTP; 2,5 mM (SpAGG3, PAAC19, paGB8, PAAC3) ali 3 mM (EAC1F04, PGL15, EAC1G5) Mg²⁺; 0,4 (EAC1G5), 0,5 (SpAGG3, PAAC3, EAC1F04, PGL15) ali 0,7 (PAAC19, paGB8) U Taq polimeraze in 1 μ l genomske DNK. PCR reakciji za lokus paGB8 smo dodali še 2 μ g/ml BSA, reakcijama za lokusa EAC1F04 in PGL15 pa 1 M betaina. Temperaturni profili in trajanje reakcij so bili enaki kot v originalnih publikacijah za posa-

Preglednica 1: Pregled vzorčenega materiala za analizo.

Vzorec	Koda in naziv sestoja	Število osebkov	tkivo za izolacijo DNK	tip vzorca
PE	6.0284 - Pevc	30	kalček	referenčni
PE ¹		19	iglice	odrasla drevesa
PE ²		30	kalček	partija semena
HRU	6.0137 - Hrušica	19	kalček	referenčni
HRU ²		30	kalček	partija semena
JER	1.0148 - Jerebikovec	30	kalček	referenčni
JER ²		30	kalček	partija semena
KON	2.0173 - Konačnik	23	kalček	referenčni
KON ¹		19	iglice	odrasla drevesa

mezni začetni oligonukleotidni par.

Produkte PCR smo po tri oziroma štiri združili in jih zmešali z deioniziranim formamidom in notranjim velikostnim standardom GS-600 LIZ. Produkte smo ločili s kapilarno elektroforezo na avtomatskem sekvenatorju ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). Elektroforegrame smo obdelali s pripadajočim programom GeneMapper in sicer tako, da smo odčitali relativne dolžine pomnoženih fragmentov.

OCENA GENETSKE PESTROSTI

Kot povprečje vseh lokusov smo izračunali naslednje kazalnike genetske pestrosti: število alelov na lokus A, število alelov neodvisno od velikosti vzorca oziroma število alelov standardizirano na najmanjši popoln multilokusni vzorec AR, število privatnih alelov APRIV, povprečno opaženo heterozigotnost HO, genetsko raznolikost HE in koeficient inbridinga FIS. Kazalnike A, AR, HE smo izračunali s programom FSTAT (Goudet, 1995); APRIV, HO s programom GenAlEx (Pekal in Smouse, 2006) in FIS s programom SpaGeDi (Hardy in Vekemans, 2002). Statistično značilnost koeficienta inbridinga smo ravno tako testirali s programom SpaGeDi z 20.000 permutacijami. Prisotnost ničelnih alelov smo preverili s programom Genepop 4.0 (Rousset, 2008).

VERJETNOST IDENTITETE IN DOLOČANJE ŠTEVILA STARŠEV

Verjetnost identitete PID za osebkke, ki so si v sorodu, smo izračunali po spodnji formuli:

$$P_m = 0,25 + (0,5 \sum p_i^2) + (0,5 \sum p_i^2) - (0,25 \sum p_i^2)$$

kjer je p_i frekvenca alelov (Taberlet in Luikart, 1999; Waits in sod., 2001).

Verjetnost identitete je konzervativna ocena verjetnosti, da imata dva naključno izbrana osebkka identičen genotip. PID izračunamo na podlagi nabora lokusov na številu posameznikov vključno z vzorci, ki jih preiskujemo. Če je PID 0,001, lahko v 999 od 1000 primerov razločimo dve naključno izbrani drevesi iz populacije. Ob zadosti majhni vrednosti PID lahko enoznačno določimo vsak osebek iz populacije. Kot so pokazale različne raziskave, lahko materin genotip rekonstruiramo z analizo zadosti velikega števila semen ali klic (Cremer in sod., 2003; Lexer in sod., 1999; Shanjani in sod., 2008). Pri iglavcih lahko uporabimo celo haploidni megagametofit, ki vsebuje samo materin genetski material (Cremer in sod., 2003; Scotti in sod., 2006). Število analiziranih megagametofitov za pravilno določanje materinega genotipa naj ne bi bilo manjše od šest (Cremer in sod., 2003; Scotti in sod., 2006).

Z naborom molekularnih označevalcev z zadosti nizko

vrednostjo PID lahko torej določimo število dreves, s katerih je bilo seme nabrano.

POTRJEVANJE IZVORA GRM

Za certificiranje GRM je potreben postopek, s katerim lahko preverimo, ali seme resnično prihaja iz navedenega sestoja. Na GIS moramo v skladu z Zakonom o gozdnem reprodukcijskem materialu (2002, 2004) in podrejenimi predpisi hraniti referenčne vzorce, lahko tudi kot izolirano genomsko DNK vzorcev z vsakega drevesa, s katerega se nabira seme za uporabo v gozdarstvu. Za smreko velja, da referenčni vzorci obsegajo po en storž na drevo.

Med referenčnimi vzorci in partijo semena iz istega sestoja bi morala obstajati večja podobnost kot med referenčnim vzorcem določenega sestoja in partijo semena, ki ne izhaja iz tega sestoja. Zato naj bi bila tudi genetska diferenciacija med vzorcema iz istega sestoja manjša kot med vzorcema, ki pripadata različnim sestojema. Na tem dejstvu temeljijo metode dodeljevanja osebkov referenčnim populacijam in metode na podlagi genetskih razdalj. Slednje bi morale biti manjše med različnimi vzorci iz istega sestoja kot med vzorci iz različnih sestojev.

Posamezne osebkke iz vzorcev, ki predstavljajo partijo semena (PE2, HRU2, JER2) in odrasla drevesa (PE1, KON1), smo poizkusili s šestimi metodami (preglednica 2) dodeliti referenčnim vzorcem (PE, HRU, JER, KON). Vseh šest metod je implementiranih v programu GeneClass2 (Piry in sod., 2004). Uporabili smo simulacijski algoritem Paetkau in sod. (2004). Število simuliranih posameznikov smo nastavili na 10.000.

Preglednica 2: Oznaka in uporabljene metode dodeljevanja osebkov z njihovimi avtorji.

oznaka	Tip metode	Avtor
A	Frekvenčna	Paetkau in sod. (1995)
B	Bayesova	Rannala in Mountain (1997)
C	Bayesova	Baudouin in Lebrun (2000)
D	Genetska razdalja D_A	Nei in sod. (1983, cit. po Takezaki in Nei, 1996)
E	Standardna genetska razdalja D_S	Nei (1972)
F	Akordna genetska razdalja D_C	Cavalli-Sforza in Edwards (1967, cit. po Takezaki in Nei, 1996)

Postopek dodeljevanja osebkov je potekal po naslednjem vrstnem redu:

- Vsakega izmed 230 osebkov smreke smo dodelili enemu izmed štirih referenčnih vzorcev na podlagi najvišje verjetnosti.
- Za vsak vzorec v simulaciji smo izračunali delež osebkov, uvrščenih v določen referenčni vzorec.
- Vsak vzorec iz simulacije smo dodelili referenčnemu vzorcu z najvišjim deležem dodeljenih osebkov.

REZULTATI

KALIVOST

Kalivost, določena po standardnem postopku (ISTA, 2004), je znašala 71 % za partijo semena iz semenskega sestojka Konačnik, 81 % iz semenskega sestojka Jerebikovec in 91 % iz semenskih sestojev Hrušica in Pevc.

GENETSKA PESTROST SEMENSKIH SESTOJEV

Skupno število opaženih alelov na lokusu se je gibalo med 18 na lokusu SpAGG3 in 60 na lokusu EAC1F04 in lokusu EA-C1G5. Privatni aleli so bili dokaj enakomerno porazdeljeni po različnih tipih podvzorcev. Najmanj jih je bilo v vzorcu PE1, ki predstavlja podvzorec odraslih dreves populacije Pevc, največ pa v podvzorcju HRU2, ki predstavlja partijo semena.

Povprečna opažena heterozigotnost (H_O) je bila 0,75. Povprečna pričakovana heterozigotnost ali genska diverziteteta pa 0,93. Manjšo opaženo heterozigotnost od pričakovane

smo prevedli v od nič statistično značilno različen povprečni koeficient inbridginga ($F_{IS} = 0,208$). F_{IS} je bil statistično značilno različen od ničelne vrednosti v kombinacijah populacija / lokus, kjer so se pojavljali ničelni aleli (rezultati niso prikazani).

VERJETNOST IDENTITETE SORODNIH OSEBKOV

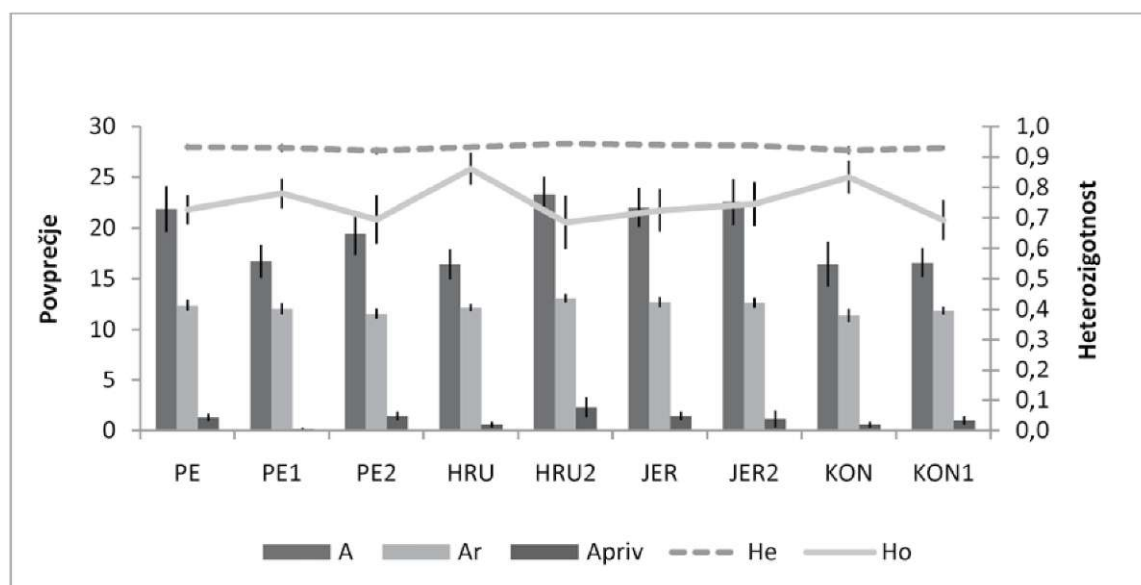
Verjetnosti, da imata dva naključno izbrana sorodna osebkova iz iste populacije identičen genotip, so podane v preglednici 3. Z izbranim naborom mikrosatelitov lahko teoretično v 9.998 primerih od 10.000 ločimo dve naključno izbrani drevesi tudi, če so v izbrani populaciji prisotne družinske strukture.

POTRJEVANJE IZVORA GRM

Izvor GRM smo poskusili potrditi tako, da smo vzorce, ki so predstavljali partije semena in odrasla drevesa s pomočjo šestih metod dodeljevali referenčnim vzorcem. Seveda

Preglednica 3: Verjetnost identitete PID (Taberlet in Luikart, 1999) po populacijah. Upoštevanih je vseh sedem lokusov.

Populacija	PID
PE	$1,78 \times 10^{-4}$
HRU	$1,63 \times 10^{-4}$
JER	$1,57 \times 10^{-4}$
KON	$2,02 \times 10^{-4}$



Slika 1: Povprečne vrednosti alelnih kazalnikov. Prikazani so število alelov na lokusu A, število alelov neodvisno od velikosti vzorca oz. število alelov, standardizirano na najmanjši popoln multilokusni vzorec A_R , število privatnih alelov A_{PRIV} , genska raznolikost H_E in povprečna opažena heterozigotnost H_O .

smo pri testiranju primernosti metod vedeli, kateri vzorci prihajajo iz istega semenskega sestaja.

Če je bil vzorec dodeljen dvema ali več referenčnim vzorcem z enakim deležem in je bil med njimi tudi pravi referenčni vzorec, štejemo, da je vzorec pravilno dodeljen referenčnemu vzorcu.

Vse metode so se izkazale dobro pri dodeljevanju osebkov iz referenčnih vzorcev samim referenčnim vzorcem. Referenčni vzorec je bil z deležem osebkov, večjim od 0,90, vedno dodeljen sam sebi. Izjema je metoda E, s katero je bil vzorec PE dodeljen sam sebi z deležem osebkov 0,87. V štirih primerih je bil vzorec iz iste populacije kot referenčni vzorec dodeljen napačnemu referenčnemu vzorcu, dvakrat z metodo A in po enkrat z metodama D in F (preglednica 4). V treh primerih gre za vzorce, pridobljene iz partije semena, enkrat za vzorec, pridobljen iz odraslih dreves.

DISKUSIJA

Genetska pestrost preučevanih vzorcev je bila velika. Število alelov, standardizirano na najmanjši popoln multilokusni vzorec AR, ki predstavlja 10 osebkov oziroma 20 kopij genov, je bilo med vsemi podvzorci izenačeno. Večje razlike so bile pri številu alelov A. Najverjetneje so posledica različno velikih vzorcev, saj z večanjem števila osebkov v vzorcu odkrijemo tudi alele z nižjo frekvenco, ne pa različne porazdelitve alelov med odraslimi drevesi, semeni v referenčnih vzorcih in tistih, ki predstavljajo partijo. Najbolj očitna razlika v številu alelov je med podvzorcema iz populacije Hrušica. Najverjetneje je razlika posledica zelo velikega števila privatnih alelov (alelov, ki jih najdemo le v enem podvzorcju) v podvzorcju HRU2.

Opaženo povprečno genetsko pestrost smo primerjali s kalivostjo, ki smo jo določili za partije semena, nabrane v

Preglednica 4: Delež osebkov iz semenskih sestojev smreke, dodeljenih štirim referenčnim vzorcem po šestih metodah dodeljevanja osebkov, navedenih v preglednici 2, s programom GeneClass2. Največji deleži osebkov v določenem referenčnem vzorcu so potemnjeni. Referenčni vzorci so prikazani v kurzivi. Podano je še število osebkov v vzorcu (n).

Metoda	A				B				C			
	PE	HRU	JER	KON	PE	HRU	JER	KON	PE	HRU	JER	KON
RV / V (N)												
PE (30)	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,97	0,00	0,00	0,03
PE1 (19)	0,84	0,00	0,16	0,00	0,63	0,11	0,21	0,05	0,63	0,05	0,16	0,16
PE2 (30)	0,77	0,07	0,13	0,03	0,40	0,23	0,27	0,10	0,37	0,20	0,20	0,23
HRU (19)	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00
HRU2 (30)	0,47	0,17	0,27	0,10	0,23	0,33	0,20	0,23	0,13	0,47	0,13	0,27
JER (30)	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,97	0,03	0,00	0,00	0,97	0,03
JER2 (30)	0,33	0,07	0,63	0,00	0,23	0,20	0,53	0,03	0,07	0,23	0,50	0,20
KON (23)	0,04	0,00	0,04	0,91	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00
KON1 (19)	0,11	0,16	0,58	0,16	0,05	0,16	0,37	0,42	0,05	0,21	0,26	0,47
Metoda	D				E				F			
RV / V (N)												
PE (30)	0,97	0,00	0,00	0,03	0,87	0,00	0,10	0,03	0,97	0,00	0,00	0,03
PE1 (19)	0,42	0,11	0,21	0,26	0,47	0,05	0,37	0,11	0,42	0,05	0,21	0,32
PE2 (30)	0,23	0,30	0,13	0,33	0,47	0,13	0,17	0,23	0,27	0,30	0,13	0,30
HRU (19)	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,95	0,05	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00
HRU2 (30)	0,10	0,47	0,13	0,30	0,20	0,30	0,23	0,27	0,10	0,50	0,13	0,27
JER (30)	0,00	0,00	0,93	0,07	0,03	0,03	0,90	0,03	0,00	0,00	0,97	0,03
JER2 (30)	0,07	0,27	0,43	0,23	0,10	0,17	0,53	0,20	0,07	0,27	0,43	0,23
KON (23)	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,04	0,96	0,00	0,00	0,00	1,00
KON1 (19)	0,00	0,21	0,26	0,53	0,00	0,16	0,37	0,53	0,00	0,21	0,21	0,58

RV referenčni vzorec; V vzorec

sestojih, ki so predmet te raziskave. Tako genetska pestrost kot tudi kalivost vsebujeta informacije o kakovosti semena. Povprečna genetska pestrost analiziranih podvzorcev je bila najnižja v populaciji Konačnik. Število alelov je bilo 16,5, število alelov, standardizirano na najmanjšo velikost vzorca, pa 11,6. Kalivost semena, nabranega v tej populaciji, je bila najmanjša izmed štirih analiziranih populacij in je znašala 71 %. Povprečna genetska pestrost ($A = 22,3$; $AR = 12,6$) je bila največja v populaciji Jerebikovec, kalivost semena iz te populacije pa je znašala 81 %. Kalivost 81 % je visoka, vendar je bila le-ta še višja v populacijah Pevc in Hrušica, kjer je znašala 91 %. Povprečna genetska pestrost obeh populacij je bila med tistima v populaciji Konačnik in Jerebikovec. V sestoji Pevc je bilo povprečno število opaženih alelov 19,3, število alelov standardizirano na najmanjšo velikost vzorca 12,0, v sestoji Hrušica pa 19,8 in 12,6. Pri primerjavi genetske pestrosti s kalivostjo se moramo zavedati, da gre pri prvi za pestrost dela genoma, ki ni pod vplivom selekcije, testi kalivosti pa so izvedeni v optimalnih pogojih.

Za določitev dejanskega materinega genotipa in s tem števila dreves, s katerih nabiramo seme, bi morali izolirati in pomnožiti DNK iz semenskega ovoja, ki vsebuje le materin genotip (Leadem, 1996) ali šestih (Scotti in sod., 2006) do 13 megagametofitov (glejte Cremer in sod., 2003) na referenčni vzorec (v praksi to pomeni analizo šest do 13 semen iz enega storža) in prešteti število različnih genotipov. Na podlagi izbranih mikrosatelitnih lokusov je bila verjetnost identitete PID namreč manjša od 10⁻² do 10⁻⁴, kar zadostuje za enoznačno določitev vsakega osebkov iz populacije (Waits in sod., 2001). Izolacija DNK iz semenskega ovoja kljub testiranju večjega števila protokolov ni bila uspešna. To je najverjetneje posledica majhne količine DNK v semenskem ovojju (Ziegenhagen in sod., 2003), ki je bila zaradi hranjenja na sobni temperaturi tudi degradirana. Ekstrakcija in analiza DNK iz šestih do trinajstih megagametofitov pa bi raziskavo podaljšala in močno podražila, zato smo se zadovoljili z dejstvom, da sta bili izolacija DNK iz megagametofita in PCR po v poglavju metode opisanih protokolih uspešni.

Da bi odgovorili na vprašanje, kako na podlagi semena iz partije dodeliti vzorec pravilnemu semenskemu sestoji, smo proučili več metod. Z metodami dodeljevanja osebkov referenčnim vzorcem in izračunu deleža osebkov v podvzorcu, ki so bili dodeljeni določenemu referenčnemu vzorcju, smo v vseh primerih na podlagi največjega deleža dodeljenih osebkov pravilno določili izvor referenčnega vzorca. Vse podvorce smo na podlagi največjega deleža dodeljenih osebkov pravim referenčnim vzorcem dodelili z obema Bayesovima metodama in metodo na podlagi standardne genetske razdalje. Nobena izmed opisanih

metod ni popolnoma zanesljiva, saj so se deleži dodeljenih osebkov pravim referenčnim vzorcem za slednje tri metode gibal med 0,30 in 0,63. Za potrebe nadzora semenarske prakse zato predlagamo uporabo kombinacije metod dodeljevanja osebkov, s katerimi primerjamo neznani vzorec z vzorci v bazi molekulskih podatkov: Rannala in Mountain (1997), Baudouin in Lebrun (2000) in Nei (standardna genetska razdalja D_s , 1972). Smiselno je tudi, da v članku predstavljene metode kombiniramo z izrisom filogenetskih dreves na podlagi genetskih razdalj in izračunom parnih vrednosti FST ter testom genotipske diferenciacije (rezultati niso prikazani). Z zadnjima metodama lahko potrdimo, da med neznanim in referenčnim vzorcem ni razlik. V primeru, da vse metode povežejo isti referenčni vzorec z neznano partijo semena, lahko z veliko verjetnostjo trdimo, da ima neznani vzorec izvor v populaciji, katero predstavlja ta referenčni vzorec. Če rezultati, dobljeni po vseh naštetih metodah, niso enaki, se zanesljivost ocene zmanjša.

Z večanjem števila genetskih podatkov o sestojih oziroma populacijah bodo predstavljene metode pridobivale na pomenu. Šele takrat bodo primerjave semenskih sestojev z ostalimi podale resnično sliko o stopnji genetske variabilnosti znotraj semenskih sestojev. Hkrati pa potrebujemo za potrjevanje izvora 'neznanih' ali sumljivih partij semena čim večje število podatkov, s katerimi lahko tovrstne partije primerjamo.

ZAHVALE

Analize so bile financirane v okviru projekta mlade raziskovalke (3331-03-831659), projekta L4-9647, JGS naloge 3 in raziskovalnega programa P04-0107 »Gozdna biologija, ekologija, tehnologija« v okviru ARRS.

LITERATURA

1. **Baudouin L., Lebrun P. (2000)** An operational bayesian approach for the identification of sexually reproduced cross-fertilized populations using molecular markers. V: International Symposium on Molecular Markers for Characterizing Genotypes and Identifying Cultivars in Horticulture, Montpellier, France, International Society for Horticultural Science: 81-93
2. **Besnard G., Acheré v., Faivre rampant P., Favre J.M., jeandroz S. (2003)** A set of cross-species amplifying microsatellite markers developed from DNA sequence databanks in *Picea* (Pinaceae). *Molecular Ecology*, 3, 3: 380-383
3. **Cremer E., Liepelt S., ziegenhagen B., Hussendörfer E. (2003)** Microsatellite and isozyme markers for seed source identification in silver fir. *Forest Genetics*, 10, 3: 165-170
4. **Geburek T.H., Heinze B. (1998)** Erhaltung genetischer Ressourcen im Wald-Normen, Programme, Maßnahmen. Landsberg, Nemčija, Ecomed-Verlagsgesellschaft, 332
5. **Goudet j. (1995)** FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *J Hered*, 86, 6: 485-486
6. **Hardy o.j., vekemans X. (2002)** Spagedi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology*, 2: 618-620
7. **ISTA (2004)** International Rules for Seed Testing. Ed. 2004. Bassersdorf, Switzerland, 5-5, 5A-50
8. **Kraigher H., Grecs z. (2004)** Operativna izvedba nove zakonodaje s področja gozdnega semenarstva in drevesničarstva. *Gozdarski vestnik*, 62, 5-6: 281-287
9. **Leadem C. (1996)** A Guide to the Biology and Use of Forest Tree Seeds BC Ministry of Forests, Victoria, 19
10. **Iexer C., Heinze B., Steinkellner H., Kampfer S., ziegenhagen B., Glössl j. (1999)** Microsatellite analysis of maternal half-sib families of *Quercus robur*, pedunculate oak: detection of seed contaminations and inference of the seed parents from the offspring. *Theor Appl Genet*, 99: 185-191
11. **Nei M. (1972)** Genetic Distance Between Populations. *The American Naturalist*, 106, 949: 283-292
12. **Paetkau D., Calvert W., Stirling i., Strobeck C. (1995)** Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology*, 4: 347-354
13. **Paetkau D., Slade D., Burden M., Estoup A. (2004)** Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology*, 13, 1: 55-65
14. **Pekall R., Smouse P.E. (2006)** GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 1: 288-295
15. **Pfeiffer A., olivieri A.M., Morgante M. (1997)** Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce (*Picea abies* K.). *Genome*, 40, 4: 411-419
16. **Piry S., Alapetite A., Cornuet j.-M., Paetkau D., Baudouin L., Estoup A. (2004)** GENECLASS2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. *J Hered*, 95, 6: 536-539
17. **Poročilo zavoda za gozdove Slovenije o gozdovih za leto 2008. (2009)** Ljubljana, Zavod za gozdove Slovenije, 134
18. **Rajora o.P., Rahman M.H., Dayanandan S., Mosseler A. (2001)** Isolation, characterization, inheritance and linkage of microsatellite DNA markers in white spruce (*Picea glauca*) and their usefulness in other spruce species. *Mol Gen Genet*, 264, 6: 871-882
19. **Rannala B., Mountain J.L. (1997)** Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 17: 9197-9201
20. **Rousset F. (2008)** genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8, 1: 103-106
21. **Scotti i., Magni F., Fink R., Powell W., Binelli G., Hedley P.E. (2000)** Microsatellite repeats are not randomly distributed within Norway spruce (*Picea abies* K.) expressed sequences. *Genome*, 43: 41-46
22. **Scotti i., Paglia G. P., Magni F., Morgante M. (2002)** Efficient development of dinucleotide microsatellite markers in Norway spruce (*Picea abies* Karst.) through dot-blot selection. *Theor Appl Genet*, 104, 6-7: 1035-1041
23. **Scotti i., Paglia G.P., Magni F., Morgante M. (2006)** Population genetics of Norway spruce (*Picea abies* Karst.) at regional scale: sensitivity of different microsatellite motif classes in detecting differentiation. *Annals of forest science*, 63: 485-491
24. **Shanjani P.S., vendramin G.G., Calagari M. (2008)** Microsatellite analysis for differentiation and identification of the source tree of *Fagus orientalis* Lipsky. *Iranian journal of biotechnology*, 6, 2: 85-91
25. **Taberlet P., Luikart G. (1999)** Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biological Journal of the Linnean Society*, 68, 1-2: 41-55
26. **Takezaki N., nei M. (1996)** Genetic Distances and Reconstruction of Phylogenetic Trees From Microsatellite DNA. *Genetics*, 144, 1: 389-399
27. **Waits L.P., Luikart G., Taberlet P. (2001)** Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology*, 10, 1: 249-56
28. **zakon o gozdnem reprodukcijskem materialu (2002, 2004)** Ur. l. RS 58/2002, 45/2004
29. **ziegenhagen B., Liepelt S., Kuhlenkamp v., Fladung M. (2003)** Molecular identification of individual oak and fir trees from maternal tissues of their fruits or seeds. *Trees* 17, 345-350