



Priročnik za gozdni genetski monitoring



LIFE13 ENV/SI/000148



LIFE13 ENV/SI/000148

Priročnik za gozdni genetski monitoring

Uredniki

Marko Bajc

Filippos A. Aravanopoulos

Marjana Westergren

Barbara Fussi

Darius Kavaliauskas

Paraskevi Alizoti

Fotios Kiourtsis

Hojka Kraigher



Studia Forestalia Slovenica, 168

ISSN 0353-6025

ISBN 978-961-6993-56-2

Založnik: Gozdarski inštitut Slovenije, založba Silva Slovenica, Ljubljana 2020

Naslov: Priročnik za gozdni genetski monitoring

Uredniki: Marko Bajc, Filippou A. Aravanopoulos, Marjana Westergren, Barbara Fussi, Darius Kavaliauskas, Paraskevi Alizoti, Fotios Kiourtsis, Hojka Kraigher

Tehnična urednika: Peter Železnik, Katja Kavčič Sonnenschein

Jezikovni pregled: Amidas

Oblikovanje: Boris Jurca, NEBIA

Tisk: Mediaplan 8

Izdaja: 1. izdaja

Cena: brezplačno

Naklada: 200 izvodov

Elektronski izvod: <http://dx.doi.org/10.20315/SFS.168>

CIP - Kataložni zapis o publikaciji
Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

630*58:630*16(082)

630*1:575.22(082)

PRIROČNIK za gozdni genetski monitoring / uredniki Marko Bajc ...
[et al.]. - 1. izd. - Ljubljana : Gozdarski inštitut Slovenije, založba Silva
Slovenica, 2020. - (Studia Forestalia Slovenica, ISSN 0353-6025 ;
168)

ISBN 978-961-6993-59-3

COBISS.SI-ID 55495427

Vsebina

- 1 UVOD
- 2 IZBIRA PLOSKVE
- 3 VZPOSTAVITEV IN VZDRŽEVANJE PLOSKVE
- 4 KAZALNIKI, VERIFIKATORJI IN DODATNE INFORMACIJE
- 5 TERENSKO DELO
- 6 LABORATORIJSKE ANALIZE IN ANALIZA PODATKOV
- 7 OCENA STROŠKOV
- 8 PODPORA ODLOČANJU PRI IZBIRI INTENZIVNOSTI GOZDNEGA GENETSKEGA MONITORINGA
- 9 SMERNICE ZA GOZDNI GENETSKI MONITORING
- 10 PRILOGE

Seznam avtorjev

UREDNIKI

Marko BAJC¹, Filippos A. ARAVANOPOULOS², Marjana WESTERGREN¹,
Barbara FUSSI³, Darius KAVALIAUSKAS³, Paraskevi ALIZOTI², Fotios KIOURTSIS⁴,
Hojka KRAIGHER¹

AVTORJI

Filippos A. ARAVANOPOULOS², Marjana WESTERGREN¹, Barbara FUSSI³,
Darius KAVALIAUSKAS³, Paraskevi ALIZOTI², Marko BAJC¹, Fotios KIOURTSIS⁴,
Monika KONNERT³, Evangelia V. AVRAMIDOU^{2,5}, Dalibor BALLIAN^{1,6},
Evangelos BARBAS², Pavlos BEKIAROGLOU⁴, Sándor BORDÁCS⁷, Gregor BOŽIČ¹,
Philip BRAILEY-JONES¹, Andrej BREZNIKAR⁸, Pavlos CHASILIDIS⁴,
Rok DAMJANIĆ¹, Natalija DOVČ¹, Anna-Maria FARSAKOGLU^{2,9},
Domen FINŽGAR^{1,10}, Nikitas FRAGKISKAKIS⁴, Ioannis GANOPOULOS^{2,11},
Berthold HEINZE¹², Ermioni MALLIAROU², Georgios ROUSAKIS⁴,
Chryse SARVANI⁴, Kristina SEVER⁸, Nataša ŠIBANC¹, Nikolaos TOURVAS²,
Živan VESELIČ⁸, Zvonimir VUJNOVIĆ¹³, Peter ŽELEZNIK¹, Hojka KRAIGHER¹

DODATNE PODATKE SO PRISPEVALI

Vlatko ANDONOVSKI¹⁴, Roland BAIER¹⁵, Mladen IVANKOVIĆ¹³, Davorin KAJBA¹⁶,
Heino KONRAD¹², Saša ORLOVIĆ¹⁷, Srđan STOJNIĆ¹⁷,

UREDNIKA BOTANIČNIH ILUSTRACIJ

Rok DAMJANIĆ¹, Katja KAVČIČ SONNENSCHNEIN¹

ZAHVALA

Ricardo ALIA¹⁸, Tjaša BALOH¹, Franc BATIČ¹⁹, Maria BELOVARSKA²⁰,
Michele BOZZANO⁹, Robert BRUS²¹, Bruno FADY²²,
Santiago C. GONZÁLES-MARTÍNEZ²², Tine GREBENC¹, Melita HRENKO¹,
Jason HUBERT²³, Katja KAVČIČ-SONNENSCHNEIN¹, Alenka KORENJAK²⁴,
Ino-Basilija KOROMPOKI², Vasiliki-Maria KOTINA², Tijana MARTINOVIĆ^{1,25},
Milan MATARUGA²⁶, Tanja MRAK¹, László NAGY²⁷, Despoina PAITARIDOU²⁸,
Marita PAPAGIANNI², Andrea R. PLUESS²⁹, Boris RANTAŠA⁸, Mari RUSANEN³⁰,
Barbara ŠTUPAR¹, Urša VILHAR¹, Ralph JENNER³, Susanne NOWAK³,
Alwin Janßen³, Barbara Buchwinkler³, Mark Walter³, Gerti Haunedinger³,
Karin Gruber³

Povezane ustanove:

1. Gozdarski inštitut Slovenije (GIS), Slovenija
2. Aristotelova univerza v Solunu (AUTh), Grčija
3. Bavarski urad za gozdno genetiko (AWG), Nemčija
4. Decentralizirana uprava Makedonije in Trakije, Generalni direktorat za gozdarstvo in podeželje, Grčija
5. Inštitut za sredozemske gozdne ekosisteme, DEMETER, Grčija
6. Univerza v Sarajevu, Fakulteta za gozdarstvo, Bosna in Hercegovina
7. Univerza Szent István (SZIE), Madžarska
8. Zavod za gozdove Slovenije (ZGS), Slovenija
9. Evropski program varovanja gozdnih genskih virov (EUFORGEN), Evropski inštitut za gozdove (EFI), Španija
10. Inštitut za evolucijsko biologijo, Univerza v Edinburgu, Združeno kraljestvo
11. Inštitut za žlahtnenje rastlin in rastlinske genske vire, HAO ELGO DEMETER, Grčija
12. Zvezni center za raziskave in usposabljanje na področju gozdov, naravnih nesreč in krajine (BFW), Avstrija
13. Hrvaški gozdarski inštitut, Jastrebarsko, Hrvaška
14. Univerza Sv. Cirila in Metoda v Skopju, Fakulteta za gozdarstvo, Severna Makedonija
15. Nacionalni park Berchtesgaden, Doktorberg 6, Berchtesgaden, 83471, Nemčija
16. Univerza v Zagrebu, Fakulteta za gozdarstvo, Hrvaška
17. Inštitut za nižinsko gozdarstvo in okolje (ILFE), Novi Sad, Srbija
18. Center za raziskave gozda, INIA, Španija
19. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Slovenija
20. Izvršna agencija za gozdove, Ministrstvo za kmetijstvo in prehrano, Sofija, Bolgarija
21. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire, Slovenija
22. Francoski državni raziskovalni inštitut za kmetijstvo, prehrano in okolje (INRAe), Francija
23. Škotsko gozdarstvo, Škotska, Velika Britanija
24. Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Slovenija
25. Laboratorij za okoljsko mikrobiologijo, Inštitut za mikrobiologijo, Češka akademija znanosti, Republika Češka
26. Univerza v Banja Luki, Fakulteta za gozdarstvo, Republika Srbska, BiH
27. Madžarski inštitut za raziskave gozda (ERTI), Madžarska
28. Ministrstvo za okolje in energijo Republike Grčije, Grčija
29. Švicarski zvezni inštitut za raziskave gozda, snega in krajine (WSL), Švica
30. Finski inštitut za naravne vire (Luke), Finska

SEZNAM AVTORJEV	4
PREDGOVOR	9
1 UVOD	11
2 IZBIRA PLOSKVE	17
2.1 Število ploskev na vrsto	18
2.1.1 Območja monitoringa	18
2.2 Število dreves na ploskev	18
2.3 Merila za izbiro ploskve	18
3 VZPOSTAVITEV IN VZDRŽEVANJE PLOSKVE	21
3.1 Uvod	22
3.2 Vzpostavitev ploskve	22
3.2.1 Sestojne vrste	24
3.2.2 Manjšinske vrste	26
3.2.3 Podploskve za monitoring mladja	28
3.3 Označevanje, georeferenciranje, terenske meritve in opazovanja	29
3.3.1 Označevanje dreves	29
3.3.2 Georeferenciranje	29
3.4 Opis ploskve (pripravljeni standardizirani obrazci)	30
3.5 Vzdrževanje ploskve	30
3.5.1 Splošno vzdrževanje	30
3.5.2 Nadomeščanje dreves	30
3.5.3 Dolgoročno vzdrževanje ploskve	31
3.6 Zbiranje meteoroloških podatkov	31
4 KAZALNIKI, VERIFIKATORJI IN DODATNE INFORMACIJE	33
4.1 Opredelitev kazalnikov, verifikatorjev in dodatnih informacij	34
4.2 Izbira kazalnikov, verifikatorjev in dodatnih informacij	35
4.3 Opis kazalnikov, verifikatorjev in dodatnih informacij	36

5	TERENSKO DELO	47
5.1	Uvod	48
5.2	Verifikatorji in dodatne informacije, ki jih opazujemo/merimo na terenu	48
5.2.1	Verifikator: mortaliteta/preživetje	49
5.2.2	Verifikator: obilnost mladja	49
5.2.3	Dodatne informacije: porazdelitev debelinskih razredov	50
5.2.4	Dodatne informacije: porazdelitev višinskih razredov	50
5.3	Fenološka opazovanja	50
5.3.1	Uvod v fenologijo	50
5.3.2	Fenološki verifikatorji in dodatne informacije	51
5.4	Vzorčenje	57
5.4.1	Postopek vzorčenja za analizo DNK	57
5.4.2	Vzorčenje semena za testiranje semena	61

6	LABORATORIJSKE ANALIZE IN ANALIZA PODATKOV	67
6.1	Uvod	68
6.2	rokovanje z vzorci in njihovo shranjevanje	68
6.2.1	Rokovanje z vzorci	68
6.2.2	Shranjevanje vzorcev	68
6.3	Testiranje semena	72
6.3.1	Ekstrakcija semena bele jelke za testiranje semena	73
6.3.2	Priprava semena bukve in bele jelke/Borisove jelke (<i>Abies borisii-regis</i>) za testiranje	74
6.3.3	Določitev absolutne mase semena	74
6.3.4	Test kalivosti	74
6.3.5	Biokemični test viabilnosti, topografski test s tetrazolom	78
6.4	Analize DNK	81
6.4.1	Ekstrakcija DNK	81
6.4.2	Genetski markerji	84
6.5	Analize podatkov	91
6.5.1	Uvod	91
6.5.2	Podatkovna zbirka	92
6.5.3	Analiza terenskih podatkov	93
6.5.4	Analiza molekularnih podatkov	100
6.5.5	Analiza podatkov testiranja semena	118
6.5.6	Ključni verifikatorji	119
6.5.7	Interpretacija vrednosti: postopen odziv na podlagi sprememb v 10 letih	119

7	OCENA STROŠKOV	133
7.1	Uvod	134
7.2	Ocena stroškov	134
7.2.1	Predpostavke pri oceni stroškov	134
7.2.2	Ocena stroškov	137
7.3	Sklepi in priporočila	147
7.3.1	Priporočila za zniževanje stroškov	148

8 **PODPORA ODLOČANJU PRI IZBIRI INTENZIVNOSTI GOZDNEGA GENETSKEGA MONITORINGA** 151

8.1 Uvod in cilj	152
8.2 Vprašanja, na katera odgovarja GGM	152
8.3 Stroški gozdnega genetskega monitoringa	153
8.4 Informativna vrednost verifikatorjev GGM	155
8.5 Ukrepi pri gospodarjenju po opravljenem GGM	155
8.6 Sporočila odločevalcem	156

9 **SMERNICE ZA GOZDNI GENETSKI MONITORING** 159

9.1 Uvod	160
9.2 Smernice za izbranih sedem vrst	162
8.2.1 Smernice za gozdni genetski monitoring bele jelke (<i>Abies alba</i> Mill.) in borisove jelke (<i>Abies borisii-regis</i> Mattf.)	163
8.2.2 Smernice za gozdni genetski monitoring navadne bukve (<i>Fagus sylvatica</i> L.)	179
8.2.3 Smernice za gozdni genetski monitoring velikega jesena (<i>Fraxinus excelsior</i> L.)	195
8.2.4 Smernice za gozdni genetski monitoring črnega bora (<i>Pinus nigra</i> J. F. Arnold)	215
8.2.5 Smernice za gozdni genetski monitoring evropskega črnega topola (<i>Populus nigra</i> L.)	235
8.2.6 Smernice za gozdni genetski monitoring divje češnje (<i>Prunus avium</i> (L.) L.)	255
8.2.7 Smernice za gozdni genetski monitoring doba (<i>Quercus robur</i> L.) in gradna (<i>Quercus petraea</i> (Matt.) Liebl.)	271

10 **PRILOGE** 293

10.1 Opis opredelitve in zemljevidi območij monitoringa	294
Območja monitoringa za jelko (<i>Abies alba</i> , <i>A. borisii-regis</i>)	295
Območja monitoringa za navadno bukev (<i>Fagus sylvatica</i>)	296
Območja monitoringa za veliki jesen (<i>Fraxinus excelsior</i>)	297
Območja monitoringa za črni bor (<i>Pinus nigra</i>)	298
Območja monitoringa za črni topol (<i>Populus nigra</i>)	299
Območja monitoringa za divjo češnjo (<i>Prunus avium</i>)	300
Območja monitoringa za hraste (<i>Quercus robur</i> , <i>Q. petraea</i>)	301
10.2 Obrazci za terensko opazovanje	304
10.2.1 Obrazec za opis ploskve	305
10.2.2 Obrazec za popis terenskih verifikatorjev	309
10.2.3 Obrazec za popis terenskih dodatnih informacij	316
10.3 Dodatne preglednice za 7. poglavje: Ocena stroškov	321



Predgovor

Priročnik za gozdni genetski monitoring LIFEENMON je glavni rezultat projekta LIFEENMON. V projektu je sodeloval konzorcij znanstvenikov in strokovnjakov pod vodstvom šestih organizacij, ki je vključeval več kot 50 raziskovalcev iz srednje in jugovzhodne Evrope. Projekt podpira varovanje gozdnih genskih virov, odpornost gozdnih ekosistemov, trajnostno gospodarjenje z gozdovi, spremljanje podnebnih sprememb ter s tem povezane procese oblikovanja politike. Ta priročnik temelji na obstoječih znanstvenih dognanjih in na spoznanjih, ki so bila pridobljena in preizkušena v okviru projekta LIFEENMON. Vsebuje specifične znanstvene postopke za izvajanje gozdnega genetskega monitoringa po vsej Evropi ter praktično usmerjena priporočila za odločevalce. Zajema tudi sistem za podporo odločanju, ki ga lahko uporabimo pri odločitvi, kakšna raven gozdnega genetskega monitoringa naj se uveljavi glede na nacionalne potrebe in sredstva, ter v podporo mednarodnim prizadevanjem za izvajanje gozdnega genetskega monitoringa.

V konzorciju LIFEENMON smo obravnavali navedena vprašanja in upamo, da bomo s svojimi prizadevanji vplivali na varovanje gozdov na različnih stopnjah – od genov do ekosistemov, od lokalne do svetovne ravni. Cilj tega priročnika je podpreti izvajanje gozdnega genetskega monitoringa v gozdarski praksi in izboljšati razumevanje pomena gozdnega genetskega monitoringa za večnamensko gospodarjenje z gozdovi.





Priročnik za gozdni genetski monitoring

poglavje 1

Uvod

Filippos A. ARAVANOPOULOS¹, Marko BAJC², Barbara FUSSI³, Hojka KRAIGHER²

Navedba: Aravanopoulos in sod., (2020) Uvod. V: Bajc in sod. (ur.), Priročnik za gozdni genetski monitoring. Gozdarski inštitut Slovenije: založba Silva Slovenica, Ljubljana, str. 11–14.
<http://dx.doi.org/10.20315/SFS.168>

Povezane ustanove:

- ¹. Aristotelova univerza v Solunu (AUTh), Grčija
- ². Gozdarski inštitut Slovenije (GIS), Slovenija
- ³. Bavarski urad za gozdno genetiko (AWG), Nemčija

Hitre podnebne spremembe vse bolj ogrožajo dolgo živeča gozdna drevesa, gozdne ekosisteme in vse ravni biotske raznovrstnosti, ki ji gozdovi dajejo zavetje ali jo zagotavljajo. Genetska raznolikost je osnovni vir biotske raznovrstnosti in je ključnega pomena za vitalnost gozdov in njihovo zmožnost prilagajanja na podnebne spremembe. Poleg tega je genetska raznolikost pomembna tudi za odpornost na druge stresne dejavnike, kot so škodljivci in bolezni.

Konvencija o biološki raznovrstnosti iz leta 1992 je najcelovitejši mednarodni sporazum in najobširnejše prizadevanje za ohranjanje biotske raznovrstnosti, vključno z genetsko raznolikostjo, na svetovni ravni. Njen 7. člen poziva, naj vsaka pogodbenica »z vzorčenjem in drugimi postopki spremlja prvine biološke raznovrstnosti« (CBD 1993). Iz potrebe po spremljanju biotske raznovrstnosti so bili razviti **kazalniki globalne biotske raznovrstnosti** (Graudal in sod. 2014), ki se odražajo tudi v kazalnikih za pozneje sprejete cilje iz Aičija (Konvencija o biološki raznovrstnosti 2010). K vzpostavitvi meril in kazalnikov za ocenjevanje genetske raznolikosti ali za spremljanje gozdnih genskih virov^{*1} so pozivali tudi v drugih mednarodnih in regionalnih procesih (npr. ministrska konferenca Forest Europe, gozdarska strategija EU, program razvoja podeželja EU, direktiva EU o rastlinskem reprodukcijskem materialu, uredba EU o invazivnih tujerodnih vrstah) (glej Bouillon in sod. 2014).

Pri spremljanju vpliva podnebnih sprememb na gozdne ekosisteme je nujno upoštevati tudi genetske vidike, saj bi le-ti morali biti vključeni v gospodarjenje z obstoječimi gozdovi in vzpostavljanjem novih, zlasti pa pri izbiri in proizvodnji semena in drugega reprodukcijskega materiala za pogozdovanje in obnovo.

Cilj gozdnega genetskega monitoringa je oceniti trenutno stanje genskih virov in časovno kvantificirati pomembne spremembe z namenom **ohranitve dolgoročnega evolucijskega potenciala** gozdnih drevesnih vrst. Z **opazovanjem sprememb v populacijah skozi čas** lahko sklepamo na njihove vzročne prvine in ocenimo njihovo sorazmerno pomembnost. Gozdni genetski monitoring je torej prognostično orodje za zagotovitev ohranjanja procesov, ki vzdržujejo genetsko variabilnost v naravnih populacijah (Aravanopoulos 2011). **Gozdni genetski monitoring lahko izboljša možnosti zgodnje zaznave potencialno škodljivih sprememb**, ki vplivajo na zmožnost **prilagajanja gozda**, preden se te pojavijo na višjih ravneh biotske raznovrstnosti (npr. na ravneh raznovrstnosti vrst ali ekosistemov), izboljša trajnostnost praks gospodarjenja z gozdovi ter usmerja nadaljnje raziskave.

Osnovna načela, ki jih je treba upoštevati pri gozdnem genetskem monitoringu, je vzpostavil **Evropski program varovanja gozdnih genskih virov (EUFORGEN)** (Aravanopoulos in sod. 2015), ki nenehno prispeva k panevropski strategiji za ohranjanje gozdnih genskih virov (De Vries in sod. 2014) ter navaja podporo vzpostavitvi panevropskega programa gozdnega genetskega monitoringa kot enega izmed operativnih ciljev v akcijskem načrtu za svojo šesto fazo (2020–2024) (EUFORGEN 2019).

Ena izmed osnovnih zahtev za izvajanje gozdnega genetskega monitoringa je **razmejitev območij monitoringa**, tj. območij, kjer bi se moral genetski monitoring izvajati, da bi imel največji učinek. V projektu LIFEGENMON (LIFE ENV/SI/000148; 2014–2020; <http://www.lifegenmon.si/>) je bila razmejitev območij monitoringa izvedena s pristopom, ki združuje obstoječe znanstveno-raziskovalne podatke in strokovno znanje ter je bil uporabljen na širokem transektu, ki sega od Bavarskih Alp v Nemčiji do Olimpa v Grčiji ter vključuje devet držav in sedem drevesnih vrst ali kompleksov vrst, ki se razlikujejo po biologiji in razširjenosti.

Genetski monitoring, kot je zastavljen v projektu LIFEGENMON, se izvaja na podlagi znanstveno podprtega sistema, ki vključuje **minimalni možni nabor konceptualnih pristopov in parametrov, s katerimi se lahko pridobi največja mogoča količina genetskih informacij** (Aravanopoulos 2016, Fussi 2016). Primer takih

¹ Organizacija Združenih narodov za prehrano in kmetijstvo (FAO) navaja: »**Gozdni genski viri** so dedni materiali, ki se ohranjajo v okviru drevesnih vrst in vrst drugih lesnatih rastlin ter med njimi [...] in imajo dejansko ali potencialno ekonomsko, okoljsko, znanstveno ali družbeno vrednost. Za prilagoditev in zaščito naših ekosistemov, pokrajin in proizvodnih sistemov so ključni, vendar so izpostavljeni vse večjim pritiskom in netrajnostni uporabi.« (<http://www.fao.org/forest-genetic-resources/background/en/>)

pristopov in parametrov je uporaba kazalnikov in verifikatorjev. **Kazalnik** se nanašajo na komponente ali procese ekosistema in služijo za sklepanje o lastnostih trajnosti povezanega vira (Aravanopoulos in sod. 2015).

Kazalnik se običajno meri v času, da odraža dosežek ali spremembo v zvezi s povezanim merilom. Biti mora neposredno merljiv, mera kazalnika pa se imenuje verifikator. **Verifikator torej vključuje oceno vrednosti podatkov, ki izboljšujejo specifičnost ocene kazalnika ali jo olajšujejo.** V praksi je verifikator mera ali meritev kazalnika (Aravanopoulos in sod. 2015). V tem priročniku je predlagano ocenjevanje gozdnega genetskega monitoringa s tremi kazalniki – selekcija, genetska variabilnost in pretok genov/sistem opravešvanja – ter skupno 15 verifikatorji. Kazalnik selekcija se ocenjuje z demografskimi verifikatorji, ki so povezani z zbiranjem terenskih podatkov. Genetska variabilnost se ocenjuje z genetskimi markerji, z vzorčenjem odraslih dreves in mladja. Tudi pretok genov/sistem opravešvanja se ocenjuje z uporabo genetskih markerjev, vendar je v vzorčenje in analizo dodatno vključeno tudi seme.

Predlagane so tri ravni gozdnega genetskega monitoringa: osnovna, standardna in napredna. Na **osnovni** ravni se na podlagi demografskih podatkov ocenjuje kazalnik selekcija; na **standardni** ravni se na podlagi demografskih (kot pri osnovni) in genetskih podatkov poleg selekcije ocenjuje še genetska variabilnost; na **napredni** ravni se poleg tega na podlagi podatkov o tujeprašnih družinah (semenih) nadalje ocenjujejo selekcija, genetska variabilnost, pretok genov in sistem opravešvanja (Aravanopoulos in sod. 2015).

V mednarodnem prostoru narašča prizadevanje za **zagotovitev dolgoročnih političnih zavez za izvajanje gozdnega genetskega monitoringa** iz naslednjih štirih razlogov: (a) kot so dokazali preizkusi, je mogoče gozdni genetski monitoring uspešno vzpostaviti; (b) gozdni genetski monitoring lahko zagotovi neprecenljiv vpogled v prihodnje stanje genetske raznolikosti in preživetje populacij, zlasti ko številne genetsko pomembne populacije gozdnih dreves (npr. marginalne, redke ali ranljive populacije) padejo pod genetsko učinkovito velikost; (c) gozdni genetski monitoring je dolg proces, ki za zanesljivo zaznavo in interpretacijo signala zahteva redne periodične ocene; (d) stroški gozdnega genetskega monitoringa segajo od nizkih za osnovno do občutnih za napredno raven.

V okviru projekta LIFEGENMON so nastali **Priročnik in Smernice za gozdni genetski monitoring**, ki zajemajo različne intenzivnosti monitoringa z različno visokimi stroški. **Sistem za podporo odločanju** je bil razvit v pomoč odločevalcem pri izbiri optimalne ravni gozdnega genetskega monitoringa glede na stroške in koristi različnih ravni takega monitoringa. Poleg tega sistem vključuje priporočila za uvedbo ukrepov za ohranitev in trajnostno uporabo gozdnih genskih virov v spreminjajočih se podnebjih.

Sistem gozdnega genetskega monitoringa, ki je bil vzpostavljen v projektu LIFEGENMON, temelji na trdnih teoretskih načelih genetskega monitoringa, kljub temu pa avtorji tega dokumenta objektivno priznavajo, da v času trajanja projekta ni bilo mogoče v celoti preizkusiti vseh vidikov gozdnega genetskega monitoringa. Ker je gozdni genetski monitoring dolgoročen proces, lahko svoj polni potencial doseže le, ko bo opravljeno zadostno število ocen v času. Kot vsak analizni sistem bo moral tudi predlagani sistem gozdnega genetskega monitoringa skozi nenehno ocenjevanje in vrednotenje, ki bosta pokazali, ali dosega pričakovane cilje monitoringa in ali ga je treba izboljšati oziroma preoblikovati (Fussi in sod. 2016).

Prihodnji razvoj gozdnega genetskega monitoringa se bo verjetno preusmeril iz genetskega v genomski monitoring. Tako se bo povečala natančnost ocen genetske raznolikosti in adaptivnega genetskega potenciala populacij. Ker se zdi, da epigenetska variabilnost vpliva na številne fenotipske lastnosti, ki sodelujejo pri lokalni adaptaciji, se bo v prihodnosti morda pojavila tudi možnost **epigenomskega monitoringa**. Na splošnejši ravni bo prihodnost gozdnega genetskega monitoringa nedvomno vključevala in s pridom izkoriščala **integracijo podatkov**, pridobljenih s spremljanjem ne le genetskih, pač pa tudi podnebnih, edafskih in fizioloških parametrov, parametrov na ravni združb itd. V tem pogledu bodo za gozdni genetski monitoring izjemno pomembne novonastajajoče **tehnologije GIS, daljinskega zaznavanja in podatkovnega rudarjenja**.

V tem priročniku sta podrobno predstavljeni osnova za gozdni genetski monitoring ter njegova uporaba na vseh omenjenih ravneh. Želimo si, da bi ta priročnik postal osrednji dokument za izvajanje gozdnega genetskega monitoringa v evropskih gozdovih in drugod ter **pripravi podlago za polno izvajanje gozdnega genetskega monitoringa za ohranjanje genskih virov in trajnostno gospodarjenje z gozdovi**.

Viri

- Aravanopoulos FA (2011) Genetic monitoring in natural perennial plant populations. *Botany* 89:75-81. <https://doi.org/10.1139/b10-087>
- Aravanopoulos FA (2016) Conservation and monitoring of tree genetic resources in temperate forests. *Current Forestry Reports* 2:119-129. <https://doi.org/10.1007/s40725-016-0038-8>
- Aravanopoulos FA, Tollefsrud MM, Graudal L, Koskela J, Katznel R, Soto A, Nagy L, Pilipovic A, Zhelev P, Bozic G & Bozzano M (2015) Development of genetic monitoring methods for genetic conservation units of forest trees in Europe. European Forest Genetic Resources Programme (EUFORGEN), Bioversity International, Rome, Italy, 62 pp.
- Bouillon P, Hubert J, Bakkebo Fjellstad K, Rusanen M, Zavrl Bogataj A, Olrik DC, Bordács S, Longauer R, Paitaridou D, Koiv K, Koskela J, Orlovic S, Black-Samuelsson S, Wolter F (2015) The implications of global, European and national policies for the conservation and use of forest genetic resources in Europe. European Forest Genetic Resources Programme (EUFORGEN), Bioversity International, Rome, Italy, 42 pp.
- Convention on Biological Diversity (2010) Strategic Plan for Biodiversity 2011–2020, including Aichi Biodiversity Targets. <https://www.cbd.int/sp/> Accessed 03 December 2020
- de Vries SMG, Alan M, Bozzano M, Buriánek V, Collin E, Cottrell J, Ivankovic M, Kelleher C, Koskela J, Rotach P, Vietto L, Yrjänä L (2015) Pan-European strategy for genetic conservation of forest trees and establishment of a core network of dynamic conservation units. European Forest Genetic Resources Programme (EUFORGEN), Bioversity International, Rome, Italy, 40 pp.
- EUFORGEN (2019) Strategic objectives and implementation plan for Phase VI (2020-2024). http://www.euforgen.org/fileadmin/templates/euforgen.org/upload/Documents/EUFORGEN_PhaseVI_Objectives_and_Plan.pdf Accessed 08 December 2020
- Food and Agriculture Organisation of the United Nations. Forest Genetic Resources. <http://www.fao.org/forest-genetic-resources/background/en/> Accessed 03 December 2020
- Fussi B, Westergren M, Aravanopoulos F, Baier R, Kavaliauskas D, Finzgar D, Alizoti P, Bozic, G, Avramidoul E, Konnert M, Kraigher H (2016) Forest genetic monitoring: an overview of concepts and definitions. *Environmental Monitoring and Assessment* 188(8):493. <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5489-7>
- Graudal L, Aravanopoulos FA, Bennadji Z, Changtragoon S, Fady B, Kjaer ED, Loo J, Ramamonjisoa L, Vendramin GG (2014) Global to local genetic diversity indicators of evolutionary potential in tree species within and outside forests. *For Ecol Manag* 333:35-51. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2014.05.002>



Priročnik za gozdni genetski monitoring

poglavje 2

Izbira ploskve

Hojka KRAIGHER¹, Marjana WESTERGRENN¹, Filippos A. ARAVANOPOULOS²,
Barbara FUSSI³, Marko BAJC¹, Dalibor BALLIAN^{1,4}, Gregor BOŽIČ¹,
Domen FINŽGAR^{1,5}, Darius KAVALIAUSKAS³, Fotios KIOURTSIS⁶,
Monika KONNERT³, Živan VESELIČ⁷

Citat: Kraigher in sod. (2020) Izbira ploskve. V: Bajc in sod. (Ur) Priročnik za gozdni genetski monitoring. Gozdarski inštitut Slovenije: Založba *Silva Slovenica*, Ljubljana, str 17-19. <http://dx.doi.org/10.20315/SFS.168>

Povezane ustanove:

1. Gozdarski inštitut Slovenije (GIS), Slovenija
2. Aristotelova univerza v Solunu (AUTH), Grčija
3. Bavarski urad za gozdno genetiko (AWG), Nemčija
4. Univerza v Sarajevu, Fakulteta za gozdarstvo, Bosna in Hercegovina
5. Inštitut za evolucijsko biologijo, Univerza v Edinburgu, Združeno kraljestvo
6. Decentralizirana uprava Makedonije in Trakije, Generalni direktorat za gozdarstvo in podeželje, Grčija
7. Zavod za gozdove Slovenije (ZGS), Slovenija

2.1 Število ploskev na vrsto

Priporočljivo je vzpostaviti vsaj eno (1) ploskev za gozdni genetski monitoring na območje monitoringa; območja monitoringa se razmejijo glede na vrsto ali kompleks vrst (glejte prilogo 10.1: Opis opredelitve in zemljevidov območij monitoringa). Če se v sosednjih državah nahaja isto območje monitoringa, se lahko z mednarodnim sodelovanjem zmanjša skupno število ploskev za gozdni genetski monitoring po državah, tako da vsako območje monitoringa predstavlja zgolj ena ploskev za gozdni genetski monitoring.

2.1.1 Območja monitoringa

Območja monitoringa je treba razmejiti na podlagi sledečih meril:

1. reprezentativna pokritost okoljskih con (glejte prilogo 10.1);
2. pokritost opisanih ras ali ekotipov, vključitev marginalnih in perifernih populacij glede na mejne zemljepisne širine in višine ter ekološke meje areala pa tudi vključitev populacij z roba areala kjer se vrsta širi in populacij z dela areala, ki se krči;
3. upoštevanje porazdelitve enot varovanja genov programa EUFORGEN (EUFORGEN, <http://portal.eufgis.org/>), tako da vsako območje genetskega monitoringa po možnosti vključuje vsaj eno enoto varovanja genov kot enoto genetskega monitoringa, če so izpolnjene ustrezne zahteve (glejte 2.3 Merila za izbiro ploskve);
4. znane ravni obstoječe genetske strukture in genetske raznovrstnosti na podlagi rezultatov raziskave genetskih markerjev;
5. ustreznosti rezultati provenienčnih preskusov (če so na voljo) in
6. na podlagi strokovnega znanja o državi je treba določiti natančne meje območij monitoringa glede na vrste gozdov, vitalnost, biotsko raznovrstnost in gospodarsko vrednost populacij.
7. Če so na voljo nejasni ali samo delni podatki, je strokovno znanje odločilni dejavnik v zadnji fazi opredelitve mej območja monitoringa. Glejte prilogo 10.1 za območja monitoringa na transektu od Bavarske do Grčije za vrste *Fagus sylvatica* L., *Abies alba* Mill./*A. borisii-regis* Mattf., *Fraxinus excelsior* L., *Populus nigra* L., *Pinus nigra* J. F. Arnold, *Prunus avium* (L.) L. in *Quercus robur* L./*Q. petraea* (Matt.) Liebl.

2.2 Število dreves na ploskev

Za genetski monitoring je treba izbrati vsaj petdeset (50) razmnoževalno aktivnih dreves na ploskev. V redkih primerih, in to samo za manjšinske drevesne vrste, se številka lahko zmanjša na 30 odraslih dreves (glejte 3. poglavje: Vzpostavitev in vzdrževanje ploskve).

2.3 Merila za izbiro ploskve

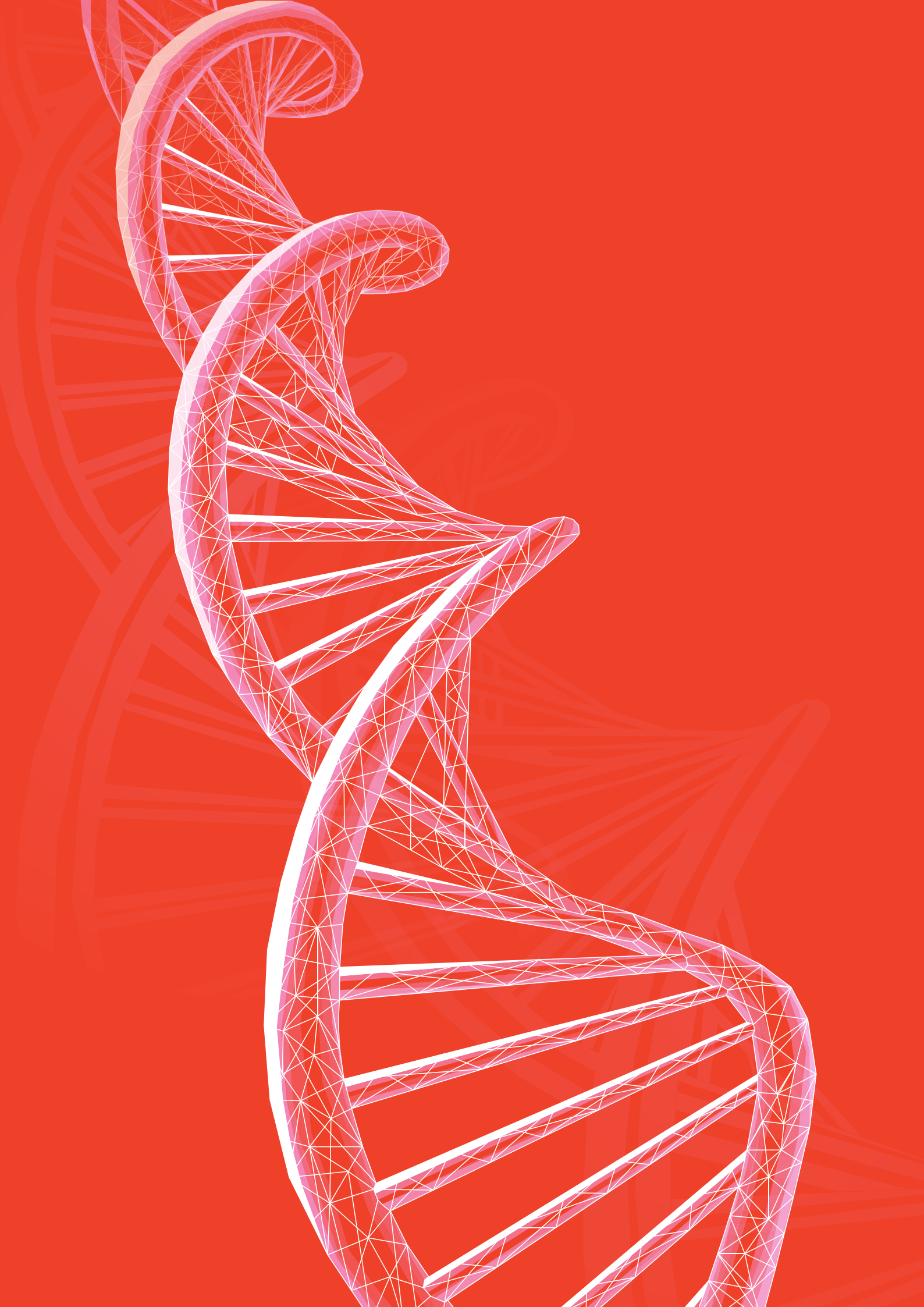
Merila od 1 do 4 temeljijo na minimalnih zahtevah sistema EUFGIS za dinamične enote varovanja genskih virov gozdnih drevesnih vrst (glejte http://portal.eufgis.org/fileadmin/templates/eufgis.org/documents/EUFGIS_Minimum_requirements.pdf).

1. Enote morajo imeti opredeljen status (npr. območje varovanja genov, odobren semenski objekt/bazični material, zaščiteno območje itd.).
2. Gospodarjenje z območjem je lahko opredeljeno kot »naravovarstveno«, »večnamensko gozdarstvo« ali druge vrste gospodarjenja, ki podpira genetske procese, ki ohranjajo dolgoročno viabilnost ciljnih drevesnih populacij. Izključevanje golosekov, ki bi nastali v okviru trenutnega in prihodnjega gospodarjenja, je ključnega pomena, da ne zakrijemo signala okoljskih sprememb v mikroevolucijskih genetskih procesih.

3. Najmanjša velikost in oblika ploskve za gozdni genetski monitoring sta odvisni od biologije ciljne drevesne vrste (glejte 3. poglavje: Vzpostavitev in vzdrževanje ploskve), vendar mora biti ploskev vzpostavljena znotraj viabilne populacije (tj. vsaj 50 razmnoževalno aktivnih dreves; v posebnih primerih, na primer pri monitoringu okrevanja ogrožene populacije, je dopustno nižje število razmnoževalno aktivnih dreves).
4. Vsaj ena drevesna vrsta v sestoji mora biti opredeljena kot ciljna vrsta za gozdni genetski monitoring. Če je cilj gozdnega genetskega monitoringa spremljati hibridizacijo, mora območje, na katerem je ploskev, vključevati zadostno število domnevnih hibridov. Priporočljivo je vzpostaviti tudi »sestrske« ploskve za čiste vrste na istem območju monitoringa.
5. Prisotnost atributov na ravni sestoja, ki so bistveni za genetski monitoring in pomenijo ekološko prilagoditev populacije lokaciji: razmnoževalno aktivna odrasla drevesa, prisotnost in preživetje naravnega mladja (če je pričakovano, na podlagi starosti gozdnega sestoja), spolno in/ali vegetativno razmnoževanje.
6. Razpoložljivost genetskih podatkov za isti ali bližnji sestoj. Sestoj se lahko sprejme ali zavrne za genetski monitoring na podlagi ugotovljene stopnje obstoječe genetske raznovrstnosti.
7. Izogibanje strmim pobočjem ali drugim topografskim lastnostim, ki bi lahko vplivale na pretok genov znotraj ploskve. To merilo ne velja za populacije na zgornji gozdni meji ali druge posebne primere, pri katerih se strmemu naklonu terena ni mogoče izogniti.
8. Vse pravne, upravne in gozdnogojitvene spremembe je treba dokumentirati.

Dodatne opombe in priporočila (to niso izločitvena merila)

9. Prednost je treba dati ploskvam, o katerih je že na voljo zgodovina sestoja (npr. izvor genskih virov, leto zadnjega goloseka, čas redčenja itd.) in velika gostota podatkov, zlasti v časovnih vrstah in natančno beleženih podatkov o ploskvi. Na primer iz enot varovanja genov, raziskovalnih ploskev, trajnih ploskev za spremljanje obroda in rasti, odobrenih semenskih objektov, ploskev državne inventure gozdov, ploskev programa ICP Forest itd. Dodatne podatke je treba upoštevati pri izbiri ploskev za monitoring in razlagi rezultatov monitoringa. Ti dodatni podatki so:
 - podnebni/okoljski podatki
 - podatki o tleh
 - podatki o vegetaciji
 - podatki o preteklem obrodu in prisotnosti naravnega mladja
10. Oddaljenost ustanove od ploskve za monitoring. Če se odločamo med več morebitnimi ploskvami, ki izpolnjujejo vsa druga merila, je prednost treba dati ploskvi, ki je najbližja ustanovi, saj lahko stroški potovanja do bolj oddaljenih ploskev bistveno zvišajo skupne stroške monitoringa (glejte 7. poglavje: Ocena stroškov).
11. Dostopnost ploskve (npr. cesta, steza, skalne ovire itd.) Če je mogoče, izbirajte ploskve za gozdni genetski monitoring, do katerih je razmeroma preprosto priti, saj je tako delovna obremenitev na terenu manjša, skupni stroški gozdnega genetskega monitoringa pa nižji.
12. Ploskve za gozdni genetski monitoring je mogoče uporabljati kot »raziskovalne središčne točke« in jih vključiti v druge programe monitoringa in raziskovalne projekte: državne gozdne inventure, program ICP Forest, ploskve za monitoring izpustov in ponorov toplogrednih plinov, raziskave in monitoring biotske raznovrstnosti gozdnih tal itd. Tak pristop bi omogočil dolgoročno nadaljevanje dejavnosti monitoringa na ploskvah za gozdni genetski monitoring, pomagal priskrbeti dolgoročno proračunsko podporo in zagotovil, da bi bilo za ploskve za gozdni genetski monitoring na voljo še več različnih vrst podatkov.



poglavje 3

Vzpostavitev in vzdrževanje ploskve

Natalija DOVČ¹, Darius KAVALIAUSKAS², Rok DAMJANIČ¹, Filippos A. ARAVANOPOULOS³, Barbara FUSSI², Marko BAJC¹, Paraskevi ALIZOTI³, Domen FINŽGAR^{1,11}, Evangelia V. AVRAMIDOU^{3,7}, Dalibor BALLIAN^{1,5}, Evangelos BARBAS³, Pavlos BEKIAROGLOU⁶, Sándor BORDÁCS³, Gregor BOŽIČ¹, Andrej BREZNIKAR⁴, Pavlos CHASILIDIS⁶, Anna-Maria FARSAKOGLU^{3,10}, Nikitas FRAGKISKAKIS⁶, Ioannis GANOPOULOS^{3,9}, Fotios KIOURTSIS⁶, Monika KONNERT², Ermioni MALLIAROU³, Georgios ROUSAKIS⁶, Chryse SARVANI⁶, Kristina SEVER⁴, Nikolaos TOURVAS³, Marjana WESTERGREN¹, Hojka KRAIGHER¹

Citat: Dovč *in sod.* (2020) Vzpostavitev in vzdrževanje ploskve. V: Bajc *in sod.* (Ur) Priročnik za gozdni genetski monitoring. Gozdarski inštitut Slovenije: Založba *Silva Slovenica*, Ljubljana, str 21–31. <http://dx.doi.org/10.20315/SFS.168>

Povezane ustanove:

1. Gozdarski inštitut Slovenije (GIS), Slovenija
2. Bavarski urad za gozdno genetiko (AWG), Nemčija
3. Aristotelova univerza v Solunu (AUTH), Grčija
4. Zavod za gozdove Slovenije (ZGS), Slovenija
5. Univerza v Sarajevu, Fakulteta za gozdarstvo, Bosna in Hercegovina
6. Decentralizirana uprava Makedonije in Trakije, Generalni direktorat za gozdarstvo in podeželje, Grčija
7. Inštitut za sredozemske gozdne ekosisteme, ELGO DEMETER, Grčija
8. Univerza Szent István, Budimpešta, Madžarska
9. Inštitut za žlahtnenje in rastlinske genske vire, HAO ELGO DEMETER, Grčija
10. Evropski program za gozdne genske vire (EUFORGEN), Evropski gozdarski inštitut (EFI), Španija
11. Inštitut za evolucijsko biologijo, Univerza v Edinburgu, Združeno kraljestvo

3.1 Uvod

Ploskev za gozdni genetski monitoring je osnovna enota, na kateri se izvaja genetski monitoring in ki je osnova za vse nadaljnje delo. Zato je zelo pomembno, da upoštevamo navodila za vzpostavitev in redno vzdrževanje ploskve.

3.2 Vzpostavitev ploskve

Ko se potrdi širše območje za gozdni genetski monitoring (tj. gozdni sestoj), se znotraj tega območja izbere manjše območje za postavitev ploskve (Slika 3.1). Za sestojne vrste se lokacija za postavitev ploskve izbere naključno, za manjšinske vrste pa je treba opraviti predhodni pregled terena izbranega sestoja.

Najbolje je, da so značilnosti ploskve take, da omogočajo nemoteno izvedbo nadaljnjih postopkov in hkrati ne vplivajo na ugotovljene vrednosti opazovanih verifikatorjev in drugih informacij v gozdnem genetskem monitoringu, zagotavljajo nizke stroške vzpostavitve ploskve in v največji možni meri zmanjšujejo možnost napak, ki bi lahko ogrozile gozdni genetski monitoring. Območjem z zmanjšano vidljivostjo (tj. gosta podrast ali visoko mladje) ali s težkimi delovnimi razmerami (tj. dolga potovalna razdalja do ploskve ali težko prehodni teren) se izognemo, če je to mogoče.

Oprema, ki jo potrebujemo za vzpostavitev ploskve:

- naprava za merjenje razdalje (priporoča se daljnogled z laserskim daljinomerom),
- kompas,
- barva s čopičem ali v sprejuza označevanje dreves,
- sprejemnik GPS, ki je dovolj natančen in omogoča shranjevanje koordinat dreves.

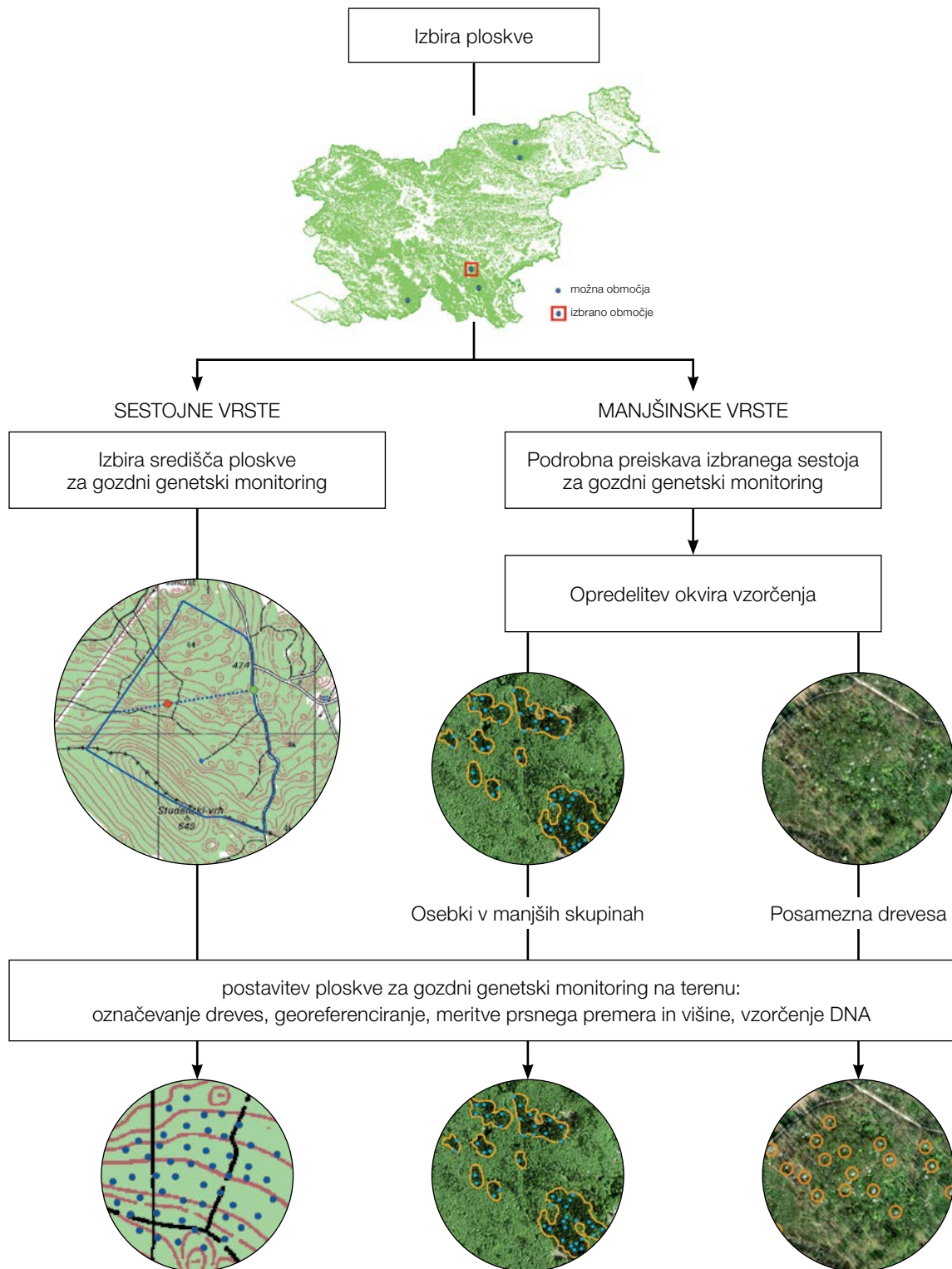
Meritve prsnega premera in drevesne višine, ki se uporabljajo za izračun porazdelitve debelinskih in višinskih razredov, je mogoče opraviti tudi med samo postavitvijo ploskve (za podrobnosti glejte 4. in 5. poglavje). Zato potrebujemo dodatno opremo:

- premerka ali merilni trak (pi-meter),
- hipsometer ali klinometer

Ploskev za gozdni genetski monitoring enodomnih vrst obsega 50 nesorodnih razmnoževalno aktivnih dreves, ki so drugo od drugega oddaljena vsaj 30 m. Za dvodomne ali funkcionalno dvodomne vrste je potrebno izbrati 25 ženskih in 25 moških dreves, ki so drugo od drugega oddaljena vsaj 30 m. Če drevo cveti, ga obravnavamo kot razmnoževalno aktivno. Zato je najprimernejši čas za vzpostavitev ploskve za gozdni genetski monitoring in izbiro dreves pomlad, ko drevesa cvetijo; npr. cvetoča drevesa divje češnje je mogoče opaziti že od daleč. Če ploskve ni mogoče vzpostaviti spomladi, lahko kot merilo za prepoznavanje razmnoževalno aktivnih endodomnih dreves uporabimo prsni premer in socialni položaj drevesa. Pri uporabi prsnega premera za prepoznavanje cvetočih dreves moramo upoštevati lokalne razmere in strokovno znanje revirnih gozdarjev. V primeru dvodomnih ali funkcionalno dvodomnih vrst je izbiro dreves nujno opraviti v času cvetenja, saj le takrat lahko nedvomno ugotovimo spol dreves.

Za vrste, pri katerih se pojavljajo kloni ali hibridi z drugimi avtohtonimi ali tujerodnimi vrstami, je treba pri izbranih drevesih najprej izvesti genotipizacijo za prepoznavo klonov in hibridov. Če je nesorodnih razmnoževalno aktivnih dreves manj kot 50, ker so bili med postavitvijo ploskve izbrani tudi kloni ali hibridi, je treba poiskati manjkajoče število dreves (ob upoštevanju deleža klonov ali hibridov) in jih genotipizirati. Postopek se po potrebi ponovi, dokler ne dosežemo skupnega števila 50 nesorodnih rodni dreves. V primeru, da je po dodatnem vzorčenju število dreves, ki niso hibridi ali kloni, večje od 50, jih za genetski monitoring 50 izberemo naključno. Če rezultati genotipizacije že pri analizi prvih 50 dreves kažejo visoko stopnjo hibridizacije, je priporočljivo izbrati drugo ploskev, razen če je namen monitoringa spremljanje hibridizacije.

Drevesne vrste so v sestoju različno porazdeljene, zato so navodila za vzpostavitev ploskve ločena za sestojne vrste in manjšinske vrste ter so dodatno razdeljena v dve fazi: (i) izbira središča ploskve za sestojne vrste ali opredelitev okvira vzorčenja za manjšinske vrste in (ii) postavitev ploskve na terenu. Navodila za manjšinske vrste obsegajo dva različna pristopa glede na gostoto populacije. V tem poglavju so poleg navodil za dva tipa vrst opisana tudi navodila za vzpostavitev podploskev za monitoring mladja.



Slika 3.1: Shema poteka vzpostavitve ploskve za gozdni genetski monitoring, ločeno za sestojne in manjšinske vrste. Za manjšinske drevesne vrste se načrtovanje prilagodi biologiji in porazdelitvi vrste. Primeri za jesen, češnjo in topol so predstavljeni v 9. poglavju: Smernice za gozdni genetski monitoring.

3.2.1 Sestojne vrste

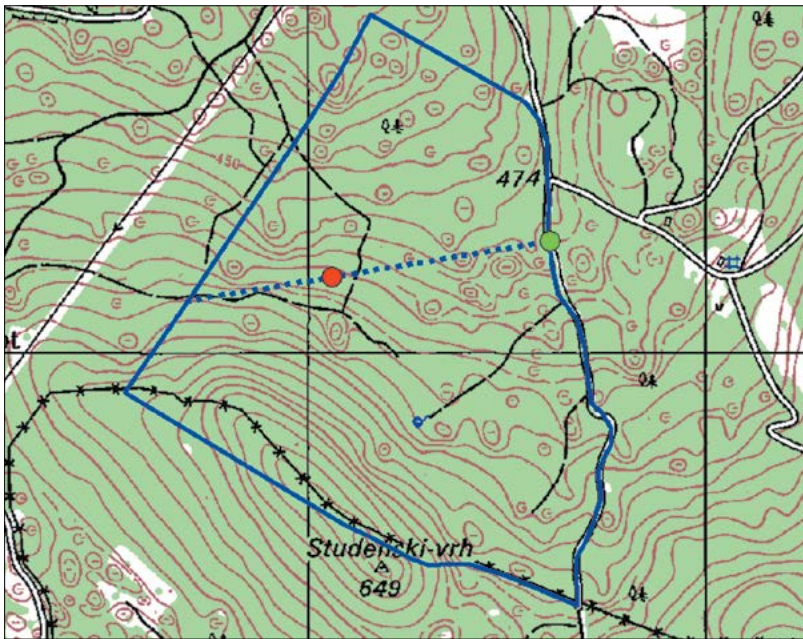
3.2.1.1 Izbira središča ploskve za gozdni genetski monitoring

Ko potrdimo območje (npr. gozdni sestoj) za izvedbo gozdnega genetskega monitoringa, naključno izberemo središče ploskve. Pri izvedbi načrta izbire dreves uporabimo metodo naključnega vzorčenja, saj je to edina statistično ustrezna možnost. Pripravimo ga z izdelavo zemljevida sestoja z uporabo katere koli programske opreme GIS, ki je na voljo (npr. ArcGIS Maps ali QGIS).

Splošni postopek za naključno izbiro središča ploskve (Slika 3.2) obsega sledeče korake:

- naključna izbira točke (zelena pika na Sliki 3.2) ob gozdni cesti ali poti, ki poteka ob sestoju,
- risanje črte, ki je približno pravokotna na cesto, iz prej omenjene naključno izbrane točke na cesti,
- naključna izbira ene točke na pravokotni črti (rdeča pika na Sliki 3.2) – ta točka je središče ploskve za gozdni genetski monitoring.

Najmanjša razdalja med točko in mejo sestoja mora biti približno 150 metrov. Če izbrana središčna točka ne ustreza temu merilu, je treba poiskati novo točko ob upoštevanju istega postopka.



Slika 3.2: Naključna izbira središča ploskve za gozdni genetski monitoring.

Obstaja možnost, da se naključno izbrana točka, ki predstavlja središče ploskve, znajde na območju, na katerem bi bilo zaradi slabe vidljivosti težko postaviti ploskev in izvajati gozdni genetski monitoring. Zato je priporočljivo po enakem postopku naključno izbrati eno ali dve rezervni točki, ki ju lahko uporabimo, če prva izbrana točka ne bi bila ustezna.

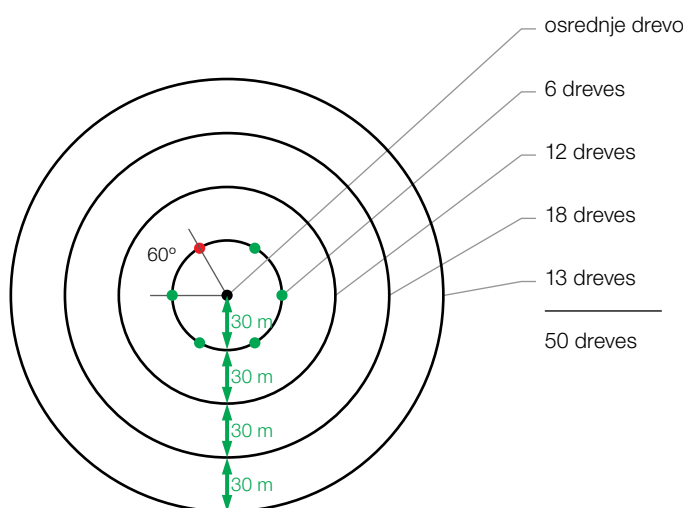
Poleg pristopa, opisanega zgoraj, je mogoče uporabiti tudi orodja za ustvarjanje naključnih točk v programske opreme GIS.

Koordinate izbrane točke shranimo v napravi GPS, ki jo bomo uporabili na terenu.

3.2.1.2 Postavitev ploskve na terenu

Razmnoževalno aktivno drevo, ki je na terenu najbližje shranjenim koordinatam GPS, postane središče ploskve in se ga označi s številko 1. Ostala drevesa izberemo okoli predhodno izbranega osrednjega drevesa v koncentričnih krogih s polmeri, ki se povečujejo za 30 metrov (Slika 3.3). Prvo drevo v vsakem od krogov izberemo naključno (na Sliki 3.3 označeno rdeče), kar lahko naredimo na različne načine: z naključnim azimutom (Preglednica 3.1), določenim od osrednjega drevesa, s pomočjo smeri sekundnega kazalca na analogni uri ali s katerim koli drugim pristopom, ki omogoča nepristransko izbiro. Druga drevesa v vsakem od krogov izberemo z ustreznim povečanjem azimuta in upoštevanjem razdalje, ki mora biti vsaj 30 metrov, vendar čim bližja 30 metrom med katerima koli drevesoma:

- +60° za prvi krog (največ šest dreves),
- +30° za drugi krog (največ 12 dreves),
- +20° za tretji krog (največ 18 dreves),
- +15° za četrti krog (največ 24 dreves).



Slika 3.3: Shema ploskve za gozdni genetski monitoring za sestojne vrste; drevesa izberemo okoli predhodno naključno izbranega osrednjega drevesa v koncentričnih krogih s polmeri, ki se povečujejo za 30 metrov. Prvo drevo v vsakem krogu (obarvano rdeče v notranjem krogu) se izbere naključno.

Če ne najdemo pričakovanega števila dreves v vsakem od notranjih treh krogov, izberemo dodatna drevesa v zunanem krogu, da dosežemo skupno število 50 dreves.

Preglednica 3.1: Naključni azimuti (v stopinjah), ki jih lahko uporabimo za izbiro prvega drevesa v vsakem od krogov.

108	15	186	35	178	29	305	351	44	150
232	23	160	141	112	292	216	83	245	214
63	65	345	234	95	78	279	323	40	236
201	313	275	144	182	68	268	289	185	92
356	177	93	1	145	198	287	251	224	142

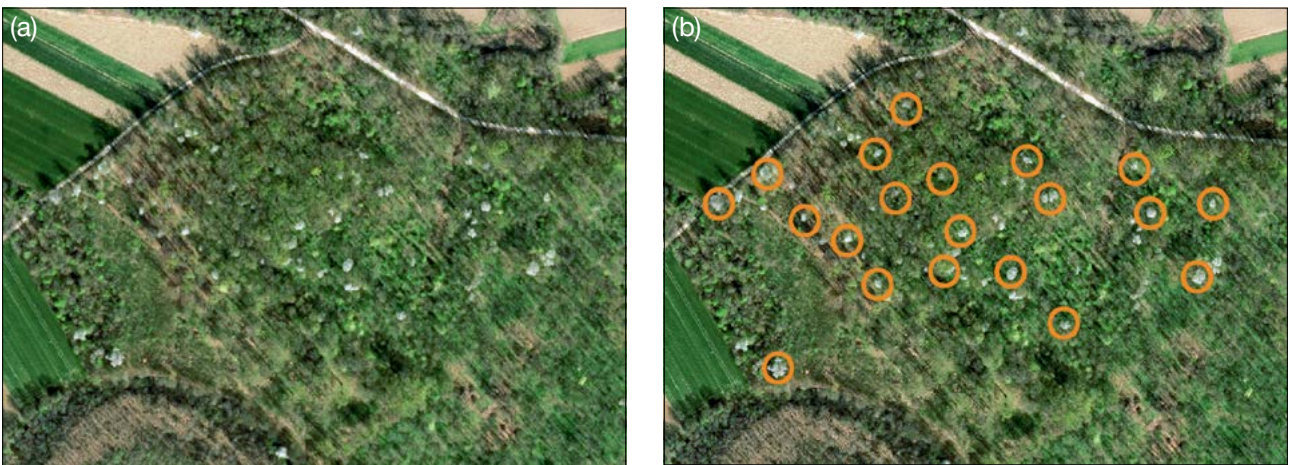
Pri izbiri drugih dreves v vsakem od krogov uporabimo ustrezno povečan azimut zlasti za iskanje približne lokacije - s hkratnim upoštevanjem največjega možnega števila dreves v posameznem krogu. To, da smo našli drevo z natančnim azimutom, včasih pomeni, da je razdalja od osrednjega drevesa bistveno daljša, to pa pomeni, da krogi postanejo neustrezno večji ali nesimetrični. Včasih se tudi zgodi, da osrednjega drevesa na ploskvi ne

vidimo zaradi različnih razlogov, na primer zaradi velikih razdalj, drugih dreves, ki zakrivajo osrednje drevo ali zaradi reliefa. V takih primerih izbira dreves temelji izključno na merilu najmanjše razdalje od treh predhodno izbranih dreves, enega drevesa iz istega kroga in dveh dreves iz prejšnjega kroga (na notranji strani). Najmanjša razdalja bi morala biti večja od 30 metrov, vendar čim bližja 30 metrom.

3.2.2 Manjšinske vrste

Zaradi velikih razlik v prostorski porazdeljenosti in gostoti dreves med različnimi populacijami manjšinskih vrst nimamo na voljo splošnega pristopa za vzpostavitev ploskve za gozdni genetski monitoring. Nekatere vrste so prisotne kot posamezna drevesa v gozdu, druge pa se pojavljajo v različno velikih skupinah v mešanih gozdnih sestojih oziroma v posebnih vzorcih. Postopek za vzpostavitev ploskve je zato treba pripraviti za vsak primer posebej, pri tem pa upoštevati skupni zahtevi 50 nesorodnih razmnoževalno aktivnih dreves in najmanjšo razdaljo 30 metrov med izbranimi drevesi. V posebnih primerih, ko gre za zelo majhno gostoto populacije (npr. ogrožene populacije, robne populacije), je število dreves dopustno zmanjšati na 30 dreves.

Ko je širše območje za izvedbo gozdnega genetskega monitoringa potrjeno (2. poglavje), je treba ožja območja, kjer je gostota vrste zadostna za vzpostavitev ploskve, na terenu dodatno podrobno preiskati. Med začetnim preiskovanjem je priporočljivo posneti pot ali shraniti lokacije vseh primernih dreves in pomladitvenih jeder z aplikacijo na pametnem telefonu (npr. Locus Map) ali s sprejemnikom GPS. Tako si bistveno olajšamo nadaljnje načrtovanje, saj je nato v programski opremi GIS mogoče videti porazdelitev dreves v sestoju, poleg tega lahko drevesa, ki jih bomo spremljali, izberemo tudi v pisarni. Če je na ortofoto posnetku območja mogoče jasno videti populacijo ciljne vrste in jo razločiti od drugih vrst, lahko namesto dodatnega preiskovanja terena pregledamo te fotografije (Slika 3.4).



Slika 3.4: (a) pregledovanje ortofoto posnetka območja in (b) izbira dreves.

Če med začetnim preiskovanjem terena shranimo lokacije dreves, je postopek vzpostavitve ploskve naslednji:

- shranjene lokacije vseh dreves vnesemo v programsko opremo GIS kot sloj točkovnih objektov,
- naključno izberemo 50 (vsaj 30) točk, ki predstavljajo drevesa z najmanjšo medsebojno razdaljo 30 metrov,
- pri vzpostavitvi ploskve moramo vnaprej izbrana drevesa na terenu najti in označiti.

Postopka za vzpostavitev ploskve, ko ne poznamo natančnih lokacij dreves, sta opisana v nadaljevanju: prvi za vrste, pri katerih se populacije pojavljajo v obliki manjših skupin dreves, in drugi za vrste s populacijami z zelo nizko gostoto, pri katerih se drevesa pojavljajo posamezno na širšem območju.

3.2.2.1 Osebki v manjših skupinah

V primeru vrst, ki v sestojih rastejo v manjših skupinah, je ploskev za gozdni genetski monitoring sestavljena iz več delnih ploskev, vsaka za svojo manjšo skupino dreves ciljne vrste. Število dreves na vsaki delni ploskvi mora biti sorazmerno velikosti skupine, vseh dreves skupaj pa mora biti 50. Skupine dreves morajo biti znotraj istega območja, kjer so okoljske razmere in vrstna sestava podobne.

A. Opredelitev okvira vzorčenja

Lokacije skupin dreves izrišemo na zemljevid v obliki poligonov, ki skupaj sestavljajo okvir vzorčenja. Drevesa znotraj skupine izberemo naključno. V programski opremi GIS znotraj vsakega poligona (skupine dreves) ustvarimo ustrezno število naključnih točk z najmanjšo medsebojno razdaljo 35 metrov (Slika 3.5). Daljšo razdaljo med naključnimi točkami uporabimo zato, da zagotovimo varnostno rezervo za zmanjšano točnost naprav GPS v gozdovih in razdaljo do najbližjega drevesa od naključne točke. Koordinate naključnih točk shranimo v napravi GPS, ki jo bomo uporabili na terenu.



Slika 3.5: V GIS programski opremi vnesenih več manjših skupin dreves z naključnimi točkami, ki predstavljajo približne lokacije dreves.

B. Postavitev ploskve za gozdni genetski monitoring na terenu

Potem ko poznamo koordinate približnih lokacij dreves, je postopek za postavitev ploskve na terenu naslednji:

- poiščemo shranjene koordinate GPS v gozdnem sestoju,
- izberemo in označimo razmnoževalno aktivno drevo, ki je najbližje shranjeni koordinati GPS.

Če gostota populacije ni zadostna za izvedbo postopka, opisanega zgoraj, lahko znotraj vseh skupin uporabimo »pristop išči in najdi« (glejte 3.2.2.2).

3.2.2.2 Posamezna drevesa (»pristop išči in najdi«)

Če se populacija pojavlja v majhnih skupinah, v katerih je samo po nekaj dreves, ali drevesa rastejo posamezno, je naključno vzorčenje z upoštevanjem zahtev za najmanjše število razmnoževalno aktivnih dreves in najmanjšo razdaljo 30 metrov zelo težko izvajati. Območje za izbiro dreves lahko postane preobsežno in zato neobvladljivo.

Poleg tega lahko začetno preiskovanje in shranjevanje lokacij dreves zahteva preveč časa in dela, zlasti če je teren težko prehodan. Zato je priporočljivo poiskati pomoč revirnih gozdarjev, ki poznajo območje in vedo, kje se ciljna vrsta najverjetneje nahaja.

A. Opredelitev okvira vzorčenja

S pomočjo revirnega gozdarja pripravimo zemljevid z označenim območjem z večjo gostoto ciljne vrste. Ob najbližji obstoječi gozdni cesti ali poti na območju izberemo eno ali več točk, ki so po presoji revirnega gozdarja najprimernejše začetne točke za iskanje dreves. Koordinate GPS teh točk shranimo v napravi GPS, ki jo bomo uporabili na terenu.

B. Postavitev ploskve za gozdni genetski monitoring na terenu

Na gozdni cesti najdemo začetno točko za preiskovanje območja, od koder hodimo proti območju z večjo gostoto ciljne vrste. Ustrezna drevesa bomo lažje našli ob pomoči revirnega gozdarja. Območje je najbolje preiskovati v sistematičnem vzorcu in z uporabo naprave GPS ali aplikacije na pametnem telefonu za snemanje poti, saj tako zagotovimo, da ne bomo večkrat preiskali istega območja ali spregledali katerega koli dela območja. Izberemo vsa razmnoževalno aktivna drevesa, ki ustrezajo zahtevi za najmanjšo razdaljo. Če nikakor ni mogoče najti 50 razmnoževalno aktivnih dreves, izberemo vsa primerna drevesa, vendar ne manj kot 30 dreves (izjemoma, če gre za ogrožene populacije ali populacije na robu!) z najmanjšo medsebojno razdaljo 30 metrov.

3.2.3 Podploskve za monitoring mladja

Znotraj vzpostavljene ploskve za gozdni genetski monitoring je treba vzpostaviti večje število – po možnosti 20 – podploskev z mladjem. Podploskve z mladjem se uporabljajo za več nalog: vzorčenje DNK in ocenjevanje obilnosti/mortalitete mladja. Vzpostavitev podploskev z mladjem izvedemo po kalitvi po vsakem močnem ali masivnem obrodu, če se obrod pojavi vsakih 3 do 12 let (Preglednica 3.2). Če se obrod pojavi vsako leto ali vsako drugo leto, se podploskve z mladjem vzpostavi po močnem/masivnem obrodu približno vsakih pet let. Pri načrtovanju vzpostavitve podploskev z mladjem je treba upoštevati dormanco semen. Na primer seme velikega jesena (*Fraxinus excelsior*) običajno dve zimi miruje v tleh, to pa pomeni, da do kalitve in vzpostavitve podploskev z mladjem pride šele dve leti po obrodu.

Preglednica 3.2: Časovni potek vzpostavitve podploskev za monitoring mladja. Po vsakem ocenjenem obrodu se vzpostavi novih dvajset podploskev z mladjem. Po možnosti se oceni dva obroda na desetletje.

Leto monitoringa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Obrod		•					•							•					•				
Vzpostavitev podploskev z mladjem			•					•							•					•			

3.2.3.1 Opredelitev okvira vzorčenja

Pomladitvena jedra iz obroda v prejšnjem koledarskem letu (upoštevajte dormanco semen) na terenu popišemo in zabeležimo njihove lokacije (koordinate GPS, številka drevesa, ki je najbližje pomladitvenemu jedru). Med vsemi pomladitvenimi jedri jih naključno izberemo 20 za postavitev podploskev z mladjem. Če je pomladitvenih jeder 20 ali manj, uporabimo vsa. Priporočljivo je popisati tudi dodatne informacije o lokaciji podploskev z mladjem, na primer razdaljo (število korakov) in azimut od najbližjega označenega odraslega drevesa, da bomo v prihodnje te podploskve lažje našli.

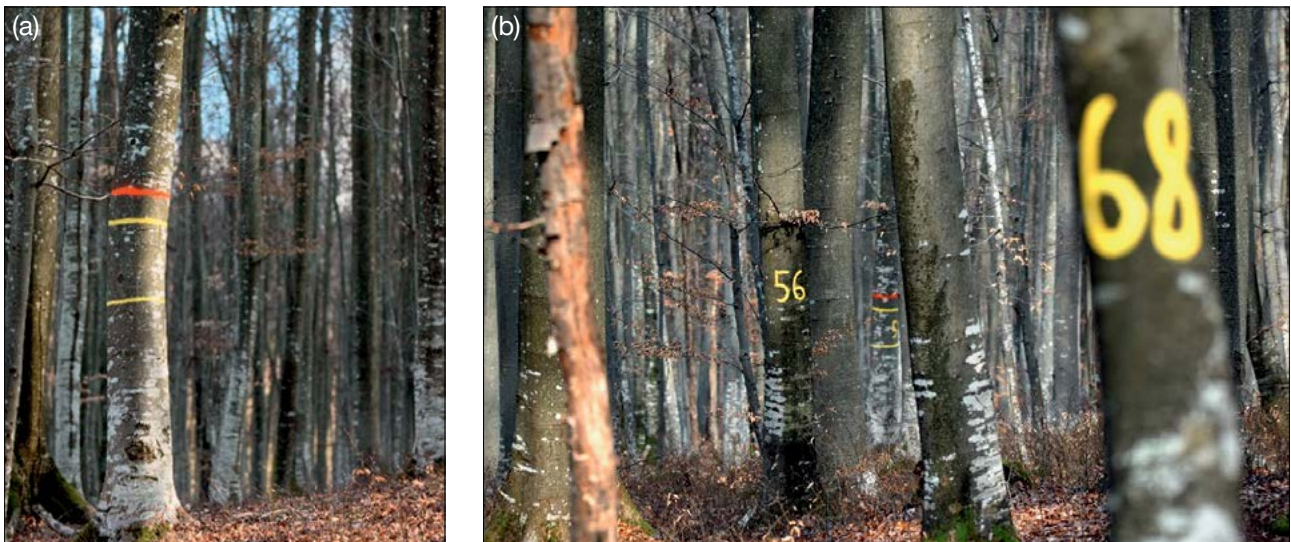
3.2.3.2 Postavitev podploskev na terenu

Znotraj vsakega izbranega pomladitvenega jedra postavimo podploskev s površino 1 m², ki jo označimo s kovinskimi palicami. Kovinske palice na vsakem oglišču podploskve z mladjem zapičimo v tla, kolikor je mogoče globoko, da jih ne bi odstranile živali. Vrhove kovinskih palic za boljše vidnost pobarvamo.

3.3 Označevanje, georeferenciranje, terenske meritve in opazovanja

3.3.1 Označevanje dreves

Vsako izbrano drevo moramo označiti z ustrežno številko in barvno črto okoli debla za večjo vidnost dreves iz vseh smeri. Osrednje drevo (številka 1) označimo z dvema ali več črtami, da se bo razlikovalo od drugih dreves (Slika 3.6a). S številko je priporočljivo označiti drevo na tisti strani, ki gleda stran od osrednjega drevesa, saj tako lažje najdemo osrednje drevo, zlasti če stojimo ob zunanjih krogih ploskve (Slika 3.6b). V nekaterih primerih je bolje, da drevesa označimo na tisti strani, ki gleda stran od poti ali cest, da ne vzbujamo radovednosti ljudi, ki se v gozdu rekreirajo.



Slika 3.6: a) osrednje drevo na ploskvi za gozdni genetski monitoring (GGM) je označeno z več črtami, da se razlikuje od drugih dreves; b) številke so označene na izbranih drevesih tako, da gledajo stran od osrednjega drevesa. Obe sliki prikazujeta drevesa na ploskvi za GGM navadne bukve (*Fagus sylvatica* L.) v Sloveniji.

3.3.2 Georeferenciranje

Izbrana drevesa znotraj ploskve za gozdni genetski monitoring georeferenciramo, kar lahko storimo že ob vzpostavitvi ploskve. Dva pristopa georeferenciranja sta opisana v nadaljevanju.

Georeferenciranje dreves najpreprosteje izvedemo tako, da shranimo lokacije izbranih dreves z uporabo sprejemnika GPS. Toda ta metoda ni primerna, če sprejemnik GPS ni dovolj točen in/ali natančen. Točnost nediferencialnih sprejemnikov GPS, ki jih običajno uporabljajo gozdarji, je včasih samo 15 metrov ali celo več v odraslih gozdovih (Simwanda in sod. 2011). Diferencialne naprave GPS so precej točnejše in natančnejše (Zhang in sod. 2014).

Drug način izvedbe georeferenciranja dreves je merjenje razdalje in azimuta od referenčne točke. Za izračun lokacij dreves lahko uporabimo spletno računalno za georeferenciranje <http://georeferencing.org/georefcalculator/gci3/source/gci3.html>, pri tem pa moramo možnost »Locality type« (Vrsta lokacije) nastaviti na »Distance at a heading« (Razdalja v smeri). Orodje omogoča izbiro različnih koordinatnih sistemov. Pomanjkljivost tega orodja je v tem, da moramo vhodne podatke vnesti za vsako drevo posebej, na primer koordinate referenčne točke, razdaljo in azimut.

Namesto računalna za georeferenciranje, predstavljenega zgoraj, je priročneje in hitreje uporabiti skript za georeferenciranje dreves, ki je bil razvit v okviru projektov LIFE GENMON in LIFE SySTEMiC (<https://github.com/roks531/Tree-georeferencing>). Skript izračuna koordinate posameznih dreves z enim samim vnosom podatkov v obliki preglednice (uporabiti je mogoče .txt ali .csv). Skript deluje s podatki v horizontalnem koordinatnem sistemu, npr. UTM. Če so koordinate začetne referenčne točke zapisane v obliki zemljepisne širine in dolžine (WGS84), jih je treba pretvoriti v horizontalni koordinatni sistem. Skript zahteva vnos dveh ločenih preglednic: prva vsebuje podatke o oznaki drevesa, izmerjeni razdalji (v metrih) od referenčne točke, azimutu (stopinje od severa) in oznaki referenčne točke iz katere se izvede georeferenciranje drevesa. Druga preglednica vsebuje oznake začetnih referenčnih točk (vsaj ene, lahko pa jih je več) ter njihove koordinate x in y. Pomembno je, da je označevanje referenčnih točk v obeh preglednicah enako.

Priporočljivo je izbrati čim manj referenčnih točk z najtočneje izmerjeno lokacijo. Če bi vsako drevo uporabili kot referenčno točko za georeferenciranje naslednjega drevesa (npr. drevo številka 1 je referenčna točka za georeferenciranje drevesa številka 2, drevo številka 2 je referenčna točka za georeferenciranje drevesa številka 3 itd.), bi se napake opazovalca povečevale, točnost lokacij dreves pa zmanjševala z zviševanjem zaporednih števil georeferenciranih dreves (Abdi in sod. 2012).

3.4 Opis ploskve (pripravljeni standardizirani obrazci)

po vzpostavitvi ploskve za gozdni genetski monitoring je treba ploskev podrobno opisati na obrazcu »GGM – Opis ploskve«, ki je sestavni del tega priročnika. Vsi zbrani podatki se nato shranijo v podatkovni zbirki (glejte poglavje 6.5.2.1). Obrazec je sestavljen iz dveh glavnih delov: (i) podatki opisa ploskve ter (ii) kakovost in opis sestoja.

Podatki opisa ploskve vsebujejo razdelke o točni lokaciji, lastništvu, vrstni sestavi gozdnega sestoja ter značilnostih regije, tal in podnebja. Določeni so tudi gozdnogojitveni sistem, cilji gospodarjenja z gozdom in opredeljen status.

Del o kakovosti in opisu sestoja je sestavljen tako, da se izbere enega od možnih odgovorov za vsak deskriptor. Ta del obrazca opisuje: zdravstveno stanje gozda, podatek o tem, ali se z gozdom gospodari ali ne, gozdni reprodukcijski material, naravno pomlajevanje, navpično in vodoravno strukturo sestoja, naklon, kakovost drevesnih debel in nekatere druge podatke.

Obrazec je na voljo v prilogi 10.2: Obrazci za terensko opazovanje.

3.5 Vzdrževanje ploskve

3.5.1 Splošno vzdrževanje

Označbe dreves in podploskev za monitoring mladja redno (vsaki dve leti) pregledujemo in po potrebi obnovimo. Kovinske palice, ki se uporabljajo za označevanje ploskev naravnega mladja, moramo po koncu monitoringa obilnosti mladja odstraniti.

3.5.2 Nadomeščanje dreves

Če opazovano drevo odmre ali se v okviru gospodarjenja poseka, ga moramo nadomestiti. Izberemo ustrezno drevo, ki je najbližje odmrlemu in izpolnjuje zahtevo po najmanjši oddaljenosti od najbližjega opazovanega drevesa, tj. 30 metrov. Če to ni mogoče, izberemo drevo z obrobla (najbolje na zunanjem krogu, če gre za sestojno vrsto) ploskve.

Če ima drevo poškodovano krošnjo, na primer zaradi vetroloma, žledoloma ali snegoloma, a lahko še obrodi, ga v monitoringu obdržimo. Vzrok poškodbe je treba zabeležiti, saj lahko poškodba vpliva na ugotovljene vrednosti

verifikatorjev in dodatnih informacij. Če je škoda prehuda in obrod ni več pričakovan, moramo opazovano drevo nadomestiti.

Pri vrstah, pri katerih najprej izberemo več kot 50 osebkov, da bi preverili prisotnost klonov ali hibridov (z določanjem genotipa), lahko kot nadomestilo za odmrli drevesa uporabimo katere koli primerne osebkke izmed teh presežnih dreves. Če smo odkrili klone med začetnim večjim številom dreves, lahko isti genotip uporabimo kot nadomestilo za odmrli osebek.

Vzrok za izgubo drevesa na ploskvi za gozdni genetski monitoring je treba ugotoviti, ga zabeležiti na obrazce in vnesti v podatkovno zbirko.

Nadomestna drevesa označimo enako kot prvotna drevesa, vendar z višjimi zaporednimi številkami (51, 52 itd.), po katerih se bodo razlikovala od nadomeščenih prvotnih dreves (s številkami od 1 do 50).

3.5.3 Dolgoročno vzdrževanje ploskve

Vrzeli v gozdu lahko nastanejo tudi v trajnostnih sistemih gospodarjenja z gozdom. Če se zaradi gospodarjenja z gozdom odstrani večje število razmnoževalno aktivnih dreves na ploskvi (npr. skupinsko postopno gospodarjenje), je treba ploskev kljub temu ohraniti ter izvajati opazovanje obilnosti mladja, cvetenja in obroda. V takih primerih število preostalih dreves zabeležimo med vsakim opazovanjem.

Tako stanje, pri katerem je genetski monitoring močno omejen zaradi zmanjšane števila razmnoževalno aktivnih dreves, lahko traja več desetletij, dokler dovolj mlajših dreves ne doseže razmnoževalne zrelosti in izpolni minimalne zahteve za vključitev v gozdni genetski monitoring. Proces izbire in nadomeščanja je treba opraviti v daljšem časovnem obdobju, da za nadomestna drevesa ne izbiramo zgolj najhitreje rastočih osebkov.

3.6 Zbiranje meteoroloških podatkov

Dandanes so podnebne spremembe verjetno glavna neposredna nevarnost, ki grozi genetski raznovrstnosti in gozdnim ekosistemom. Posredno tudi povečujejo tveganja za pojav bolezni, patogenov, škodljivcev, požarov in ekstremnih vremenskih dogodkov. Okoljski dejavniki pomembno vplivajo na uspešnost razmnoževanja, rast in sposobnost preživetja dreves. Pri gozdnem genetskem monitoringu je številne verifikatorje mogoče delno razložiti s spremembami okoljskih parametrov, npr. temperaturo in padavinami. Zato je za razlago sprememb različnih verifikatorjev priporočljivo namestiti zapisovalnike meteoroloških podatkov neposredno na ploskev. Internet stvari (IoT) se hitro razvija, prav tako tudi zapisovalniki podatkov in različna okoljska tipala. Zapisovalniki meteoroloških podatkov so zdaj cenejši, preprosteje jih je namestiti in omogočajo preprosto oddaljeno zbiranje podatkov. Podatki se, na primer, po povezavi 2G/3G/4G ali lokalnem omrežju Wi-Fi prenašajo v podatkovno zbirko v oblaku ali na strežnik FTP, nato jih je mogoče izvoziti in analizirati.

Poleg tega je meteorološke podatke mogoče pridobiti in ekstrapolirati iz bližnjih vremenskih postaj. Toda ta pristop ni priporočljiv na lokacijah z zelo heterogenimi razmerami ali mikroklimami.

Viri

Abdi E, Sisakht S R, Goushbor L, Soufi H (2012) Accuracy assessment of GPS and surveying technique in forest road mapping. *Ann For Res* 55:309-317

Simwanda M, Wing MG, Sessions J (2011) Evaluating global positioning system accuracy for forest biomass transportation tracking within varying forest canopy. *West J Appl For* 26:165-173. <https://doi.org/10.1093/wjaf/26.4.165>

Zhang H, Zheng J, Dorr G, Zhou H, Ge Y (2014) Testing of GPS accuracy for precision forestry applications. *Arab J Sci Eng* 39: 237 - 245. <https://doi.org/10.1007/s13369-013-0861-1>





Priročnik za gozdni genetski monitoring

poglavje 4

Kazalniki, verifikatorji in dodatne informacije

Filippos A. ARAVANOPOULOS¹, Darius KAVALIAUSKAS², Barbara FUSSI², Marjana WESTERGRENN³, Paraskevi ALIZOTI⁴, Marko BAJC³, Nikolaos TOURVAS¹, Andrej BREZNIKAR⁴, Pavlos CHASILIDIS⁵, Rok DAMJANIĆ³, Natalija DOVČ³, Fotios KIOURTSIS⁵, Ermioni MALLIAROU¹, Hojka KRAIGHER³

Citat: Aravanopoulos in sod. (2020) Kazalniki, verifikatorji in dodatne informacije. V: Bajc in sod. (ur) Priročnik za gozdni genetski monitoring. Gozdarski inštitut Slovenije: Založba *Silva Slovenica*, Ljubljana, str 33–44. <http://dx.doi.org/10.20315/SFS.168>

Povezane ustanove:

1. Aristotelova univerza v Solunu (AUTH), Grčija
2. Bavarski urad za gozdno genetiko (AWG), Nemčija
3. Gozdarski inštitut Slovenije (GIS), Slovenija
4. Zavod za gozdove Slovenije (ZGS), Slovenija
5. Decentralizirana uprava Makedonije in Trakije, Generalni direktorat za gozdarstvo in podeželje, Grčija

4.1 Opredelitev kazalnikov, verifikatorjev in dodatnih informacij

Genetski monitoring se mora izvajati na podlagi zanesljivega, znanstveno podprtega sistema, ki vključuje minimalni nabor konceptualnih pristopov in parametrov, s katerimi pridobimo največjo mogočo količino genetskih informacij (Aravanopoulos 2011, 2016, Konnert in sod. 2011). Primer takih pristopov in parametrov je uporaba meril, kazalnikov in verifikatorjev. Merilo je standard, po katerem je subjekt ocenjen, ne da bi bil sam neposredna mera uspešnosti (Boyle 2000, Aravanopoulos in sod. 2015). Merilo zato običajno odraža (celovit) cilj, ki je pogosto precej kompleksen in ga je težko oceniti (Graudal in sod. 2014, Aravanopoulos 2016). Kazalniki se nanašajo na komponente ali procese ekosistema in služijo za sklepanje o lastnostih trajnosti vira (Boyle 2000, Aravanopoulos in sod. 2015). Kazalniki se glede na opredelitev uporabljajo za sledenje napredka in bi morali biti vedno opredeljeni glede na določen cilj (Feld in sod. 2009). Kazalniki se običajno merijo v času in odražajo dosežke ali spremembe v zvezi s povezanim merilom. Kazalniki za ocenjevanje biotske raznovrstnosti spadajo v eno od štirih kategorij: stanje, obremenitev, odziv in korist (Graudal in sod. 2014, Sparks in sod. 2011, UNEP/WCMC 2011). Kazalniki gozdnega genetskega monitoringa na ravni populacije so gotovo kazalniki stanja, tj. kazalniki, ki se nanašajo na stanje biotske raznovrstnosti (Graudal in sod. 2014, Aravanopoulos 2016).

Kot tak mora biti kazalnik neposredno merljiv, mera vrednotenja kazalnika pa se imenuje verifikator. Verifikator torej vključuje oceno vrednosti parametrov, ki izboljšujejo specifičnost ocene kazalnika ali jo olajšujejo (Boyle 2000, Aravanopoulos in sod. 2015). V praksi je verifikator mera ali meritev kazalnika (Aravanopoulos in sod. 2015).

V tem dokumentu se za gozdni genetski monitoring uporablja eno samo merilo: ohranjanje genetske raznolikosti in evolucijskega potenciala v naravnih populacijah, pri katerem je poudarek na vzdrževanju evolucijskih procesov v populacijah gozdnih dreves za zaščito njihovega potenciala za nenehno prilagajanje (Aravanopoulos 2011, Namkoong in sod. 1996). Znanstvena osnova genetskega monitoringa je genekološki pristop, glavne evolucijske sile na mikroravni pa predstavljajo trije dejavniki: naravna selekcija, genetski zdrs in pretok genov. Učinki naravne selekcije lahko privedejo do diferenciacije, povezane z lokalno adaptacijo, medtem ko lahko genetski zdrs privede do diferenciacije, povezane s stohastičnimi spremembami in genetsko erozijo. Te spremembe usmerja pretok genov, ki lahko privede do genske homogenizacije. Mutacije se štejejo za nepomembne v relativno kratkotrajnih procesih (Aravanopoulos 2011, 2016). Zato se genetski monitoring osredotoča na časovno vrednotenje treh kazalnikov: (1) naravne selekcije, (2) genetske variabilnosti kot take, v katero je vključeno tudi vrednotenje genetskega zdrsa, in (3) pretoka genov/sistema opraševanja. Ocena posameznega kazalnika temelji na več verifikatorjih, ki so predstavljeni v nadaljevanju. Število verifikatorjev na kazalnik sega od števila, ki se šteje za absolutno najmanjše število (ključni verifikatorji), potrebno za oceno kazalnika, do najbolj celovitega (optimalnega) vrednotenja, v katero so vključeni vsi verifikatorji, navedeni v nadaljevanju.

V zvezi z verifikatorji so lahko pomembne tudi dodatne informacije – če ne za oceno stanja kazalnika (tako kot je verifikator), pa za zagotovitev podatkov, ki pomagajo pri sklepanju na stanje enote genetskega monitoringa ter pri interpretaciji vrednosti parametra verifikatorja in njegove potencialne relativne spremembe. Take splošnejše informacije so v tem dokumentu predstavljene kot »dodatne informacije«.

4.2 Izbira kazalnikov, verifikatorjev in dodatnih informacij

Kazalniki in verifikatorji za program gozdnega genetskega monitoringa v tem priročniku so predstavljeni v Preglednici 4.2.1. Izbranim kazalnikom ustrezajo izbrani verifikatorji in dodatne informacije.

Preglednica 4.2.1: Seznam kazalnikov in verifikatorjev/dodatnih informacij za gozdni genetski monitoring na osnovni, standardni in napredni ravni. X: raven, na kateri je določen verifikator popisan. V: verifikator, DI: dodatne informacije.

Kazalnik	Ime verifikatorja	Vrsta	Osnovna	Standardna	Napredna
Selekcija	mortaliteta/preživetje	V	X	X	X
	obilnost mladja	V	X	X	X
	cvetenje	V	X	X	X
	obrod	V	X	X	X
	% polnih semen	V			X
	% kalitve	V			X
	odmiranje krošnje (veliki jesen)	BI	X	X	X
	razmerje med spoloma (dvodomne vrste)	BI		X	X
	porazdelitev debelinskih razredov	BI		X	X
	porazdelitev višinskih razredov	BI		X	X
	usklajenost cvetenja	BI			X
	olistanje	BI		X	X
	senescenca	BI		X	X
	Genetska variabilnost	alelne frekvence	V		X
latentni genetski potencial		V		X	X
koeficient oprasovanja med sorodniki		V		X	X
efektivna velikost populacije		V		X	X
alelno bogastvo		V		X	X
vezavno neravnovesje		V		X	X
medvrstna hibridizacija*		BI		X	X
genetska množičnost		BI		X	X
Pretok genov/ sistem oprasovanja	F test osamelcev	BI		X	X
	pretok genov	V			X
	multilokusna stopnja oprasovanja med nesrodnimi osebkami	V			X
	dejanska stopnja oprasovanja med sorodniki	V			X
	Efektivno število donorjev peloda	BI			X
stopnja oprasovanja med sorodnimi starši**	BI			X	

* Samo za vrste pri katerih v naravi prihaja do križanja.

** Izključuje samooprasovanje pri endomnih vrstah

Izbira kazalnikov in verifikatorjev upošteva tri ravni genetskega monitoringa – osnovno, standardno in napredno. Izbira temelji na: (1) predpostavki celovite ocene kazalnika z uporabo najmanjšega števila verifikatorjev (Aravanopoulos 2011, Aravanopoulos in sod. 2015), (2) primernosti posameznega verifikatorja za časovno vrednotenje ter (3) času in stroških, potrebnih za oceno posameznega verifikatorja (glejte 7. poglavje: Ocena stroškov). Skupno je 15 verifikatorjev, šest za selekcijo, šest za genetsko variabilnost in trije za kazalnik pretok genov/sistem oprasovanja. Poleg tega je potrebnih do dvanajst parametrov v obliki dodatnih informacij, od katerih je sedem povezanih s selekcijo, trije z genetsko variabilnostjo in dva s pretokom genov/sistemom oprasovanja. Od 15 verifikatorjev so štiri povezani s kvantitativnimi terenskimi opazovanji, devet jih je izpeljanih iz analize molekularnogenetskih markerjev in dva iz testiranja semena. Dejansko število ocenjenih parametrov kot dodatnih

informacij je odvisno od specifičnosti opazovane vrste, saj niso vsi pomembni za vse vrste. Dodatno informacijo »razmerje med spoloma« se na primer ocenjuje samo pri dvodomnih vrstah.

4.3 Opis kazalnikov, verifikatorjev in dodatnih informacij

Kazalnik I: SELEKCIJA

Selekcija je ključni kazalnik, saj gre za evolucijsko silo, ki lahko v le nekaj generacijah spremeni alelne frekvence. S selekcijo se populacija bolj prilagodi sedanjim okoljskim razmeram, čeprav lahko pri tem pride do zmanjšanja genetske raznolikosti. Zato je ocena selekcije kompleksen sestavni del gozdnega genetskega monitoringa, ki se izvaja na vseh ravneh.

Verifikator: mortaliteta/preživetje

Sprememba trenda, ki presega pričakovano stopnjo mortalitete ali preživetja (mortaliteta = 1 – preživetje), kaže na prisotnost selekcijskega pritiska, tj. odmiranje, kadar je vrednost mortalitete povečana. Mortaliteta/preživetje se nanaša na število oziroma delež odmrlih/preživelih dreves glede na izhodiščno število (in prejšnjo oceno).

Verifikator: obilnost naravnega mladja

Sprememba obilnosti mladja na ploskvi lahko kaže na prisotnost selekcijskega pritiska, ki je povzročil zmanjšanje števila mladja, njegovo odsotnost ali odmiranje. Obilnost mladja je opredeljena kot število mladja na enoto površine.

Verifikator: cvetenje

Odsotnost cvetenja lahko negativno vpliva na panmiktično ravnovesje (El-Kassaby in sod. 1984, 1988), kar lahko privede do nenaključnega navzkrižnega opraševanja in večje stopnje samoopraševanja (Bhumibhamon 1978). Prisotnost, obilnost in čas cvetenja so zelo občutljivi na okoljske pogoje, zato je fenologija cvetenja ena od najbolj nestalnih lastnosti rastlin (Chuine 2010). Fenologija cvetenja je proučevanje časa razvoja moškega in ženskega cveta s popisom različnih fenoloških faz (Ducci in sod. 2012). Fenologija cvetenja je ključni dejavnik, ki vpliva na sposobnost reprodukcije dreves, do katere pride z izmenjavo genov med genotipi, kar določa genetsko variabilnost proizvedenega semena in uspešnost preživetja mladja, ki vzklje iz le-tega (Alizoti in sod. 2010).

Verifikator: obrod

Obrod je tvorba reproduktivnih organov in plodov rastline (Merriam-Webster's 2003). Je glavna determinanta pri prenosu genskih informacij s staršev na potomce. Je glavni dejavnik uspešnosti reprodukcije genotipov in populacij (Müller-Starck in sod. 2005, Seifert in Müller-Starck 2009). Jakost in periodičnost zaporednih obrodov sta značilni za posamezno vrsto in se spreminjata glede na vremenske razmere, razpoložljivost virov in genetski nadzor (Mund in sod. 2010 ter tam navedeni viri). Zato je jakost obroda pri nekaterih gozdnih drevesnih vrstah spremenljiva in zato te v nekaterih letih močno obrodijo, v drugih pa manj ali celo nič. Pomembno je opozoriti, da se reprodukcija dreves ene vrste pogosto sinhronizira na večjih površinah, kar je posledica genetske in okoljske interakcije (Selås in sod. 2002, Seifert in Müller-Starck 2009). Obrod je pomemben parameter pri interpretaciji vrednosti efektivne velikosti populacije.

Verifikator: odstotek polnih semen

Sprememba odstotka polnih semen kaže na selekcijski pritisk (v primeru zmanjšanja) ali na okrevanje (v primeru povečanja). Je tudi pomemben parameter pri interpretaciji vrednosti efektivne velikosti populacije. Odstotek

polnih semen se oceni za drevo, katerega plodovi/semena so bili vzorčeni. Ocena temelji na številu polnih semen v naključnem vzorcu 1000 semen, ki se pretvori v odstotek. Ker opraševanje med sorodniki ali samooprašitev negativno vplivata na delež polnih semen, je ocena odstotka polnih semen pomemben parameter za oceno dejanske stopnje opraševanja med sorodniki.

Verifikator: odstotek kalitve

Kalivost v spreminjajočih se okoljskih razmerah vpliva na razširjenost in številčnost vrste. Tudi če drevesa obrodijo, lahko stres, povezan s podnebnimi spremembami, negativno vpliva na kalitev in povzroči odsotnost naravnega mladja (de Melo in sod. 2015, Wang in sod. 2016). Pri gozdnem genetskem monitoringu je mogoče reproduktivno sposobnost, ki kaže na sposobnost osebka, da preživi in se razmnožuje, oceniti kot kombiniran odstotek polnih semen in kalitve (na podlagi skupnega števila vzorčenih semen in skupnega števila vzklitih polnih semen) (Aravanopoulos 2011, Aravanopoulos in sod. 2015, Aravanopoulos 2016). V skladu s pravili ISTA (2020) je cilj testa kalitve določiti največji potencial za kalitev partije semena, ki ga je mogoče nato uporabiti za primerjavo kakovosti različnih partij semena in tudi pri oceni te vrednosti pri sajenju na prosto. Za testiranje viabilnosti semena je na voljo več različnih metod. Vendar je najbolj natančna in zanesljiva metoda test kalitve (Rao in sod. 2006). Kalitev semena pri laboratorijskem testu temelji na nastanku in razvoju sadike do faze, v kateri je iz analize ključnih struktur razvidno, ali se lahko ob ugodnih razmerah v tleh razvije v uspešno rastlino. Odstotek kalitve pomeni delež semen, ki so v razmerah, značilnih za posamezno vrsto, in v določenem obdobju tvorila sadike, ki jih razvrščamo med normalne (ISTA 2020).

Dodatne informacije: odmiranje krošnje (samo jesen)

Odmiranje krošnje je dodatna informacija, ki se uporablja samo pri gozdnem genetskem monitoringu jesenov (*Fraxinus sp.*) in se uporablja za ocenjevanje resnosti škode, ki jo povzroča gliva *Hymenoscyphus fraxineus*, povzročiteljica jesenovega ožiga, kronične glivične bolezni jesenov v Evropi.

Dodatne informacije: razmerje med spoloma (dvodomne vrste)

Razmerje med spoloma se nanaša na popis spola posameznega drevesa pri dvodomnih ali funkcionalno dvodomnih vrstah. Razmerje med spoloma je pomembno, saj bolj kot sta spola enakomerno porazdeljena, večjo učinkovito velikost populacije lahko pričakujemo.

Dodatne informacije: porazdelitev debelinskih razredov

Sprememba v porazdelitveni krivulji prsnega premera dreves na ploskvi lahko kaže na delovanje selekcijskega pritiska, tj. odmiranje odraslih ali mladih dreves.

Dodatne informacije: porazdelitev višinskih razredov

Sprememba v porazdelitveni krivulji višine dreves na ploskvi lahko kaže na delovanje selekcijskega pritiska, tj. prenehanje rasti ali odmiranje odraslih ali mladih dreves.

Dodatne informacije: usklajenost cvetenja

Usklajenost cvetenja, sočasno zorenje ženskih in moških cvetov, zagotavlja sovpadanje receptivnosti ženskega cveta in trosenja peloda in zato vpliva na panmiktično ravnovesje (El-Kassaby in sod. 1984, 1988). V panmiksiji naj bi imela vsa moška in ženska starševska drevesa enako verjetnost sodelovanja v enakih dogodkih opraševanja in križanja z vsemi osebki drugega spola. Če cvetenje ni usklajeno, lahko pride do nenaključnega navzkrižnega opraševanja, višjega odstotka praznih semen in večje stopnje samooprašitve (Bhumibhamon 1978).

Dodatne informacije: olistanje

Olistanje je obdobje od konca dormance brstov do dolžinske rasti poganjkov (konec olistanja). Določa ga več okoljskih dejavnikov (zimске in pomladne temperature), ki so potrebni za začetek procesa, vendar ga močno nadzirajo tudi geni (Geburek 2004, Ducci in sod. 2012). Podatki o času in trajanju olistanja dajejo pomembne informacije o odzivu drevesa in populacije na spreminjajoče se okoljske razmere. Podatki o fenoloških fazah (tj. fenofazah) olistanja so potrebni za celovito oceno različnih vidikov v okviru gozdnega genetskega monitoringa. Sposobnost vrste, da se dolgoročno prilagodi abiotičnim okoljskim razmeram s spremembami v fenologiji, je mogoče šteti za kazalnik njene občutljivosti na prihodnje podnebne spremembe. Glavni cilj opazovanj olistanja na ploskvah gozdnega genetskega monitoringa je zagotoviti dodatne informacije o fenotipski plastičnosti populacije gozdnih dreves med letom.

Dodatne informacije: senescenca

Senescenca je skupno zaporedje degenerativnih dogodkov, ki zmanjšajo metabolno aktivnost ter povzročijo odmrtje celic, tkiv in listov kot organa. Senescenco pogojujejo številni okoljski, fiziološki in genetski dejavniki. Informacije o času in trajanju senescence so pomembne za razumevanje dejanskega stanja posameznih dreves in populacij gozdnih drevesnih vrst v spreminjajočem se okolju.

Kazalnik II: GENETSKA VARIABILNOST

Genetska variabilnost je predpogoj za prilagajanje spremembam in evolucijo. Ocenjevala naj bi se s parametri, navedenimi v nadaljevanju. Razlika v parametrih, ki odražajo genetsko variabilnost, npr. zmanjšanje take variabilnosti, bi odražala zmanjšanje genetske raznolikosti in potencialno tudi zmanjšanje adaptivne sposobnosti populacije.

Verifikator: alelne frekvence

Sprememba alelnih frekvenc lahko kaže na spremembo v obsegu genetske variabilnosti. Odkritje sprememb frekvence in tudi izguba alelov je znak za spremembo v genetski raznolikosti, ki jo je mogoče pripisati eni ali kombinaciji različnih evolucijskih sil, ki delujejo v genekološkem modelu. Alelne frekvence in spremembe v klični variabilnosti je mogoče oceniti s proučevanjem populacij na vsem območju razširjenosti, rezultati pa lahko razkrijejo dokaze adaptivnega odziva na okoljske spremembe. Ta verifikator lahko sam po sebi ne zadošča, zato ga je treba vedno obravnavati v povezavi z drugimi verifikatorji kazalnika genetska variabilnost.

Verifikator: alelno bogastvo

Alelno bogastvo je skupno število alelov v populaciji za en lokus, izračunano kot povprečje za vse lokuse. Alelno bogastvo je ocena, popravljena z velikostjo vzorca (tj. z razredčitvijo). Kot merilo genetske raznolikosti se uporablja manj pogosto kot heterozigotnost, ker je pri alelnem bogastvu težje upoštevati stohastični proces genetskega zdrsa. Kljub temu se alelno bogastvo šteje za parameter, ki je bolj uporaben v ohranitveni gentiki kot enakomernost razporeditve alelov (angl.: *allelic evenness*) (tj. heterozigotnost) (Brown in Schoen 1992, Rajora in Mosseler 2001, Aravanopoulos 2011). Ta verifikator je povezan z uporabo mikrosatelitnih (SSR) genetskih markerjev.

Verifikator: latentni genetski potencial

Latentni genetski potencial (LGP) je pomemben genetski parameter, ki odraža sposobnost populacije, da ohrani prilagodljivost v raznolikih, spreminjajočih se okoljskih razmerah (Stebbins in Hartl 1988, Bergmann in sod. 1990). Genetska analiza populacije razkrije njen »delovni genetski potencial« (tj. del njene genetske sestave, ki zagotavlja preživetje populacije v sedanjih razmerah in je analogen učinkovitemu številu alelov), preostali del genetskega

potenciala pa je trenutno »latenten«. Ta del genetske raznolikosti je povezan z aleli z nizko frekvenco v populaciji, ki pa lahko imajo pomembno vlogo pri prihodnji prilagoditvi v drastično spreminjajočih se okoljskih razmerah, kar je lahko velikega pomena za ohranitvene aktivnosti (Aravanopoulos 2011, 2016). Zato lahko sprememba latentnega genetskega potenciala, zlasti pa njegovo zmanjšanje, kaže na zmanjšanje splošne adaptivne sposobnosti populacije. Latentni genetski potencial se izračuna kot razlika med skupnim in efektivnim številom alelov, ki se sešteje za vse lokuse.

Verifikator: koeficient opravevanja med sorodniki

Koeficient opravevanja med sorodniki (F_{IS}) je korelacija med gametama, ki se združujeta, in gametami, naključno izbranimi iz podpopulacije. Opisuje variabilnost pri osebkih glede na podpopulacije. F_{IS} je odvisen od razmerja ugotovljenih heterozigotov glede na heterozigote, pričakovane v skladu s Hardy-Weinbergovim ravnovesjem, zato ga je mogoče šteti tudi kot zmanjšanje heterozigotnosti osebkov v primerjavi s podpopulacijo v okviru več (pod) populacij, ki tvorijo celotno (meta)populacijo. Večja stopnja opravevanja med sorodniki je povezana s potencialnim zmanjšanjem genetske raznolikosti.

Verifikator: efektivna velikost populacije

Efektivna velikost populacije (N_e) je eden od najpomembnejših genetskih parametrov (če ne najpomembnejši) za genetski monitoring, saj postane pri majhni efektivni velikosti populacije genetski zdrs veliko pomembnejši od selekcije in ima pglavitno vlogo v evlucijskem procesu. Zato sprememba efektivne velikosti populacije, zlasti pa njeno zmanjšanje pod sprejemljiv prag, kaže na začetek genetskega zdrsa (pa tudi opravevanja med sorodniki). Kaže torej na začetek naključnih in stohastičnih procesov v populaciji in opravevanja med sorodniki ter potencialno zmanjšanje genetske variabilnosti, kar v splošnem odpira vprašanja o prihodnji adaptivni sposobnosti populacije. Efektivna velikost populacije je opredeljena kot število posameznikov, ki bodo s križanjem prispevali gene naslednji generaciji ali, bolj formalno, efektivna velikost dejanske populacije je število osebkov v teoretično idealni populaciji z enako stopnjo naključnega genetskega zdrsa kot v dejanski populaciji. V naravnih populacijah je izjemno težko oceniti njeno efektivno velikost na podlagi demografskih modelov in trenutno se pri najpogostejših pristopih uporabljajo genetski markerji. Poleg tega se zdi, da so genetske ocene bolj konzervativne kot demografski modeli. V tem protokolu temelji ocena efektivne velikosti populacije na genetskih markerjih.

Verifikator: vezavno neravnovesje

Vezavno neravnovesje (angl.: *linkage disequilibrium*) je nenaključno združevanje alelov na različnih lokusih v vsaki populaciji; do njega pride, kadar je frekvenca združevanja različnih alelov na lokusu višja ali nižja od frekvence, ki bi jo pričakovali, če bi se lokusi združevali naključno (tj. če bi bili neodvisni) (Weir 1979). Na vezavno neravnovesje lahko vplivajo evlucijske sile in demografske značilnosti (struktura populacije, nespolno razmnoževanje). Vezavno neravnovesje se na primer pokaže ali postane izrazitejšo v majhnih populacijah, v populacijah, na katere delujejo močne evlucijske sile, ali v populacijah, ki se mešajo. Zato je lahko vezavno neravnovesje močan pokazatelj delovanja genetskih in demografskih procesov v populaciji.

Dodatne informacije: medvrstna hibridizacija

Ocena medvrstne hibridizacije je pomemben parameter, če ploskev ali večja površina vsebuje simpatrične populacije taksonov, ki se lahko navzkrižno opravejujejo. Ta položaj pri gozdnih drevesih, npr. jelki, hrastu, jesenu, topolu, ni nepogost. Ocena križanja med vrstami je ključna pri ocenjevanju cilja ohranitve v smislu zadevnega taksona. Gre za zelo dinamičen pojav v smislu postopne evlucije genetske raznolikosti, zato je pomembno, da pri odkritju sprememb v vrednostih genetske raznolikosti, ugotovimo, ali je k temu prispevala medvrstna hibridizacija. Medvrstna hibridizacija se pogosto šteje za vir genetskih in fenotipskih novosti ter za evlucijsko silo (npr. Leroy in sod. 2017), vendar lahko povzroči tudi genetsko erozijo in prekine integriteto vrste ter privede do

njenega izumrtja (Soltis in Soltis 2009, Vit in sod. 2014, Neale in Wheeler 2019). Analiza medvrstne hibridizacije zahteva genotipizacijo domnevnih križancev z za vrsto specifičnimi genetskimi markerji ob vključitvi referenčnih vzorcev obeh starševskih vrst. V idealnem primeru bi moral biti uporabljen za vrsto specifičen genetski marker, ki se nahaja na istem genetskem lokusu pri obeh starševskih vrstah, pri katerih so fiksirani različni aleli, ki pa so variabilni v populaciji hibridov. Hibridizacija se izračuna kot odstotek, število osebkov od celote, ki imajo alele, specifične za obe vrsti. Odvisno od števila lokusov in alelov, primernih za oceno medvrstnega križanja, je mogoče dobiti tudi več informacij, kot je odstotek povratnih križancev ali nadaljnjih filialnih generacij.

Dodatne informacije: genetska množičnost

Genetska množičnost (angl.: *genetic multiplicity*), tudi hipotetična multilokusna gametska raznolikost, V_{gam} (angl.: hypothetical gametic multilocus diversity, V_{gam}), je dejanska ali potencialna sposobnost populacije, da zagotovi alelne rešitve kot odziv na okoljske spremembe. Genetska množičnost odraža parameter genetske variabilnosti, ki je pomemben pri okoljskih spremembah. Kaže na potencial populacije, da proizvede genetsko različne gamete, ki lahko oblikujejo naslednjo generacijo (Müller-Starck 1995), in kvantificira sposobnost populacij gozdnih dreves, da ustvarijo genetsko variabilnost in tako olajšajo prilagoditev na spreminjajoče se okoljske razmere (Gregorius in sod. 1986, Müller-Starck 1995). Zato lahko sprememba genetske množičnosti, zlasti pa njeno zmanjšanje, kaže na zmanjšanje splošne adaptivne sposobnosti populacije. Meri se kot največje možno število različnih alelov, največje število možnih genotipov (na ravni osebkov ali na lokus), odstotek polimorfnihih lokusov (P) in povprečno število alelov na lokus. Ocenjuje se kot zbirka zgoraj navedenih parametrov.

Dodatne informacije: F test osamelcev

Odkrivanje lokusov osamelcev je analiza na ravni populacije, pri kateri se uporabljajo ocene genetske diferenciacije populacije za odkrivanje lokusov s precej večjo ali manjšo genetsko diferenciacijo, kot bi jo pričakovali glede na nevtralnost. Na takih lokusih, ki imajo nenavaden vzorec variabilnosti, verjetno poteka selekcija.

Kazalnik III: PRETOK GENOV/SISTEM OPRAŠEVANJA

Pri pretoku genov in sistemu opráševanja gre za kazalnik, ki omogoča spremljanje stopnje izmenjave genov med osebki in populacijami, kar je ključen proces za prihodnjo prilagoditev in evolucijo. Ocenjuje se s parametri, navedenimi v nadaljevanju.

Verifikator: pretok genov (N_m)

Pretok genov je izmenjava genov med populacijami, ki se razlikujejo v genotipskih frekvencah, s semeni in pelodom. Pretok genov je določen s sistemom opráševanja, ki usmerja gensko rekombinacijo in razporejanje genov med generacijami ter določa, v kolikšnem obsegu se geni izmenjujejo med osebki in populacijami (Aravanopoulos 2011). Z vidika ohranitvene genetike, gozdnega genetskega monitoringa ali gojenja dreves se lahko šteje za koristnega ali škodljivega (Burczyk in sod. 2004). Pretok genov povzroči spremembe v sestavi genofonda (alelnih frekvenc) prevzemne populacije z vključitvijo alelov v njen genofond. Z uvedbo novih alelov s pretokom genov se poveča genetska variabilnost v populaciji, omogočene pa so tudi evolucija in kombinacije lastnosti (Encyclopaedia Britannica 2019, Mallet 1999, Burczyk in sod. 2004, Aravanopoulos 2011). Merjenje pretoka genov zagotavlja posredne informacije o stopnji migracije med subpopulacijami.

Verifikator: multilokusna ocena opráševanja med nesorodnimi osebki (t_m)

Sistem opráševanja je eden od ključnih dejavnikov, ki oblikujejo genetsko strukturo populacije (Hartl in Clark 1989, Del Castillo in Trujillo 2008, Whitehead in sod. 2018). Različni sistemi opráševanja vplivajo na stopnjo in dinamiko genetske raznolikosti, efektivno velikost in diferenciacijo populacije ter v splošnem na vzdržnost in

prilagoditev populacije (Del Castillo in Trujillo 2008). Za sisteme opráševanja rastlin je običajno značilen mešani model, pri katerem del semen in rastlin iz teh semen izvira z različnih stopenj opráševanja med sorodniki, preostali (večji) del pa iz naključnega opráševanja med nesorodnimi osebki (Ritland 2002). Opráševanje med nesorodnimi osebki spodbuja pretok genov, homogenizira populacije ter povečuje heterozigotnost in vezavno ravnovesje gamet (Del Castillo in Trujillo 2008). Opráševanje med genetsko nesorodnimi osebki je nasprotje opráševanju med sorodnimi osebki (Aravanopoulos 2011). Multilokusna ocena opráševanja med nesorodnimi osebki (tm) je ocena deleža potomstva, ki v populaciji kot celoti nastane z opráševanjem med nesorodnimi osebki, pri čemer dogodki opráševanja vključujejo opráševanje med sorodnimi in nesorodnimi osebki. Razlika v multilokusni oceni opráševanja med nesorodnimi osebki (tm), na primer njeno povečanje, je znak ohranjanja, če ne povečanja multilokusne genetske variabilnosti, posledica tega pa bo verjetno ohranjanje adaptivne sposobnosti populacije.

Verifikator: dejanska stopnja opráševanja med sorodniki

Ocena dejanske stopnje opráševanja med sorodniki (enolokusna in multilokusna) temelji na podatkih o semenu in genetskih podatkih (Rajora in sod. 2000a, 2002; O' Connell in sod. 2006). Tudi to je pomemben parameter, saj lahko na primer povečanje stopnje opráševanja med sorodniki privede do fiksacije alelov in zmanjšanja genetske raznolikosti populacije. Ocena stopnje opráševanja med sorodniki lahko temelji samo na markerjih, a ker lahko potencialno izroditev zaradi opráševanja med sorodniki negativno vpliva na semenitev in kalivost, je dejanska stopnja opráševanja med sorodniki bolj zanesljiva. Dejanska stopnja opráševanja med sorodniki se izračuna s kombiniranjem ocen samooprašitve (1 – tm) iz analize sistema opráševanja in ocen opráševanja med sorodniki na podlagi lastnosti semen. Je razmerje: [število praznih semen na plod + (število polnih semen na plod × stopnja samooprašitve)] / [število semen, nastalih z oprášitvijo med sorodniki, na plod + število polnih semen na plod].

Dodatne informacije: efektivno število donorjev peloda (Nep)

Efektivno število donorjev peloda je število donorjev peloda, ki prispevajo k posamezni družini semen. Efektivno število donorjev peloda je pogosto veliko manjše od absolutnega števila donorjev peloda (Ritland 1989, Smouse in Sork 2004, Sork in Smouse 2006). Če je število donorjev peloda majhno, so lahko potomci genetsko manj raznoliki (Apsit in sod. 2002). Informacije o verjetnosti, da imajo potomci istega očeta, lahko razkrijejo obseg raznolikosti nabora donorjev peloda in so kazalnik efektivnega števila donorjev peloda (Nep) za določeno materinsko rastlino (Ritland 1989). Pri alogamnih vrstah je lahko dejansko število donorjev peloda občutljivejši kazalnik opráševanja kot stopnja opráševanja med nesorodnimi osebki sama po sebi. Opráševanje med nesorodnimi osebki lahko omogoči le eno samo nesorodno drevo, zato je zelo pomembno vedeti, ali opráševanje med nesorodnimi osebki vključuje malo ali veliko drugih dreves.

Dodatne informacije: stopnja opráševanja med sorodnimi starši

Opráševanje med sorodniki vpliva na evolucijo številnih rastlinskih in živalskih populacij (Porcher in Lande 2016). Opráševanje med sorodniki ima številne negativne posledice; zmanjša lahko na primer efektivno velikost populacije (Paland in Schmid 2003, Tallmon in sod. 2004) ter hitrost prilagajanja populacije (Glémin in Ronfort 2013). Opráševanje med sorodnimi endodmnimi rastlinami lahko poteka prek dveh različnih mehanizmov: (a) opráševanja med sorodnikoma, ko rastlino opráši sorodni osebek, ali (b) samooprašitve, ko rastlina opráši sama sebe (Furstenau in Cartwright 2017). Opráševanje med sorodniki poteka različno pogosto v številnih naravnih populacijah, pri katerih pogosto zaznamo tudi precej visoko stopnjo samooprašitve (Ritland 2002, Porcher in Lande 2016). V nasprotju z naključnim opráševanjem se opráševanje med sorodnimi starši kaže kot navidezna samooprašitev ali povečanje homozigotnosti (Ritland 2002).

Viri

- Alizoti PG, Kilimis K, Gallios P (2010) Temporal and spatial variation of flowering among *Pinus nigra* Arn. clones under changing climatic conditions. For Ecol Manag 259:786–797. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2009.06.029>
- Apsit VJ, Dyer RJ, Sork VL (2002) Patterns of mating in an insect-pollinated tree species in the Missouri Ozark Forest Ecosystem Project. In: Shifley SR; Kabrick JM (eds) Proceedings of the Second Missouri Ozark Forest Ecosystem Project Symposium: Post-treatment results of the landscape experiment. General Technical Report NC-227. US Dept of Agriculture, Forest Service, North Central Forest Experiment Station, St. Paul, MN, pp 212-226. <https://doi.org/10.2737/NC-GTR-227>
- Aravanopoulos FA (2011) Genetic monitoring in natural perennial plant populations. Botany 89:75-81. <https://doi.org/10.1139/B10-087>
- Aravanopoulos FA (2016) Conservation and monitoring of tree genetic resources in temperate forests. Curr For Rep 2(2):29-119. <https://doi.org/10.1007/s40725-016-0038-8>
- Aravanopoulos FA, Tollefsrud MM, Kätzel R, Soto A, Graudal L, Nagy L, Koskela J, Bozzano M, Pilipovic A, Zhelev P, Božič G (2015) Development of genetic monitoring methods for genetic conservation units of forest trees in Europe. European Forest Genetic Resources Programme (EUFORGEN), Bioversity International, Rome, Italy
- Bergmann F, Gregorius HR, Larsen JB (1990) Levels of genetic variation in European Silver fir (*Abies alba*) - Are They Related to the Species Decline? Genetica 82(1):1-10. <https://doi.org/10.1007/BF00057667>
- Bhumibhamon S (1978) Studies on Scots pine seed orchards in Finland with special emphasis on the genetic composition of the seed. Commun Inst For Fenn 94:1–118
- Boyle TJ (2000) Criteria and indicators for the conservation of genetic diversity. In: Young A, Boshier T, Boyle T (eds) Forest conservation genetics. CSIRO Publ., Collingwood, pp 239-251
- Brown AHD, Schoen DJ (1992) Plant population genetic structure and biological conservation. In: Sandlund OT, Hindar K, Brown AHD (eds) Conservation of Biodiversity for Sustainable Development Scandinavian University Press, Oslo, pp 88-104.
- Burczyk J, DiFazio SP, Adams WT (2004) Gene flow in forest trees: How far do genes really travel? For Genet 11:179-192
- Chaine I (2010) Why does phenology drive species distribution? Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 365:3149–3160. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0142>
- de Melo RB, Franco AC, Silva CO, Piedade MTF, Ferreira CS (2015) Seed germination and seedling development in response to submergence in tree species of the Central Amazonian floodplains. AoB Plants 7:plv041. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plv041>
- Del Castillo RF, Trujillo S (2008) Effect of inbreeding depression on outcrossing rates among populations of a tropical pine. New Phytol 177:517-524. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02260.x>
- Ducci F, De Cuyper B, Pâques LE, Proietti R, Wolf H (2012) Reference protocols for assessment of trait and reference genotypes to be used as standards in international research projects. CRA SEL, Arezzo, Italy
- El-Kassaby YA, Fashler AMK, Sziklai O (1984) Reproductive phenology and its impact on genetically improved seed production in a Douglas-fir seed orchard. Silvae Genet 33:120–125.
- El-Kassaby YA, Ritland L, Fashler AMK, Devitt D (1988) The role of reproductive phenology upon the mating system of a Douglas-fir seed orchard. Silvae Genet 37: 76–82
- Encyclopaedia Britannica (2019) »Gene flow«. Encyclopædia Britannica. <https://www.britannica.com/science/gene-flow>. Accessed 16 December 2019
- Feld CK, da Silva PM, Sousa JP, De Bello F, Bugter R, Grandin U, Hering D, Lavorel S, Mountford O, Pardo I, Pärtel M, Römbke J, Sandin L, Jones KB, Harrison P (2009) Indicators of biodiversity and ecosystem services: a synthesis across ecosystems and spatial scales. OIKOS 118:1862-1871. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2009.17860.x>
- Furstenau TN, Cartwright RA (2017) The impact of self-incompatibility systems on the prevention of biparental inbreeding. PeerJ 5:e4085. <https://doi.org/10.7717/peerj.4085/supp-1>
- Geburek T (2004) Die Weitergabe genetischer Information - eine wichtige Komponente bei der Waldverjüngung. BFW-Praxisinformation 4:18-20.
- Glémin S, Ronfort J (2013) Adaptation and maladaptation in selfing and outcrossing species: new mutations versus standing variation. Evolution 67:225-240. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2012.01778.x>
- Graudal L, Aravanopoulos F, Bennadji Z, Changtragoon S, Fady B, Kjær ED, Loo J, Ramamonjisoa L, Vendramin GG (2014) Global to local genetic diversity indicators of evolutionary potential in tree species within and outside forests. For Ecol Manag 333:35-51. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2014.05.002>
- Gregorius HR, Krauhausen J, Müller-Starck G (1986) Spatial and temporal genetic differentiation among the seed in a stand of *Fagus sylvatica* L. Heredity 57:255-262. <https://doi.org/10.1038/hdy.1986.116>

- Hartl DL, Clark AG (1989) Principles of population genetics, 2nd edn. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA
- International Seed Testing Association (ISTA) (2020) International Rules for Seed Testing. Bassersdorf, Switzerland. <https://doi.org/10.15258/istarules.2020.F>
- Konnert M, Maurer W, Degen B, Kätzel R (2011) Genetic monitoring in forests - early warning and controlling system for ecosystemic changes. *Iforest* 4:77-81. <https://doi.org/10.3832/for0571-004>
- Leroy T, Roux C, Villate L, Bodénès C, Romiguier J, Paiva JAP, Dossat C, Aury JM, Plomion C, Kremer A, (2017) Extensive recent secondary contacts between four European white oak species. *New Phytol* 214:865–878. <https://doi.org/10.1111/nph.14413>
- Mallet J (2001) Gene flow. In: Woiwod IP, Reynolds DR, Thomas CD (eds) Insect movement: Mechanisms and consequences: Proceedings of the Royal Entomological Society's 20th Symposium. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp 337-360
- Merriam-Webster (n.d.) "Outcrossing". *Merriam-Webster.com Dictionary*. <https://www.merriam-webster.com/dictionary/outcrossing>. Accessed 16 December 2019
- Merriam-Webster Inc. (2003) Merriam-Webster's collegiate dictionary, 11th edn. Merriam-Webster Incorporated, Springfield, Massachusetts, USA
- Müller-Starck G (1995) Genetic variation in high elevated populations of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in Switzerland. *Silvae Genet* 44:356-361
- Müller-Starck G., Ziehe M., Schubert R. (2005) Genetic diversity parameters associated with viability selection, reproductive efficiency, and growth in forest tree species. In: Scherer-Lorenzen M, Körner C, Schulze ED (eds) Forest diversity and function. Ecological studies (Analysis and synthesis), vol 176. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 87-108. https://doi.org/10.1007/3-540-26599-6_5
- Mund M, Kutsch WL, Wirth C, Kahl T, Knohl A, Skomarkova MV, Schulze ED (2010) The influence of climate and fructification on the inter-annual variability of stem growth and net primary productivity in an old-growth, mixed beech forest. *Tree Physiol* 30:689-704. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpq027>
- Namkoong G, Boyle T, Gregorious HR, Joly H, Savolainen O, Ratman W, Young A (1996) Testing criteria and indicators for assessing the sustainability of forest management: genetic criteria and indicators. Working paper No. 10. Centre for International Forestry Research, Bogor, Indonesia. <https://doi.org/10.17528/cifor/000070>
- Neale DB, Wheeler NC (2019) Hybridization and Introgression. In: The Conifers: Genomes, Variation and Evolution. Springer, Cham, pp 387-429. https://doi.org/10.1007/978-3-319-46807-5_15
- O'Connell LM, Mosseler A, Rajora OP (2006) Impacts of forest fragmentation on the mating system and genetic diversity of white spruce (*Picea glauca*) at the landscape level. *Heredity* 97 (6): 418–426. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800886>.
- Paland S, Schmid B (2003) Population size and the nature of genetic load in *Gentianella germanica*. *Evolution* 57:2242-2251. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2003.tb00236.x>
- Porcher E, Lande R (2016) Inbreeding depression under mixed outcrossing, self-fertilization and sib-mating. *BMC Evol Biol* 16:105. <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0668-2>
- Rajora OP, Mosseler A, Major JE (2000) Indicators of population viability in red spruce, *Picea rubens*. II. Genetic diversity, population structure, and mating behavior. *Can J Bot* 78:941–956. <https://doi.org/10.1139/b00-066>
- Rajora OP, Mosseler A (2001) Challenges and opportunities for conservation of forest genetic resources. *Euphytica* 118:197–212. <https://doi.org/10.1023/A:1004150525384>
- Rajora OP, Mosseler A, Major JE (2002) Mating system and reproductive fitness traits of eastern white pine (*Pinus strobus*) in large, central versus small, isolated, populations. *Can J Bot* 80(11): 1173–1184. doi:10.1139/B02-105.
- Rao NK, Hanson J, Dulloo ME, Ghosh K, Nowell D, Larinde M (2006) Manual of seed handling in genebanks. Handbooks for Genebanks No. 8. Bioversity International, Rome, Italy
- Ritland K (1989) Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*. *Evolution* 43:848-859. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1989.tb05182.x>
- Ritland K (2002) Extensions of models for the estimation of mating systems using *n* independent loci. *Heredity* 88:221-228. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800029>
- Seifert T, Müller-Starck G (2009) Impacts of fructification on biomass production and correlated genetic effects in Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.). *Eur J For Res* 128:155. <https://doi.org/10.1007/s10342-008-0219-5>
- Selås V, Piovesan G, Adams JM, Bernabei M (2002) Climatic factors controlling reproduction and growth of Norway spruce in southern Norway. *Can J For Res* 32:217-225. <https://doi.org/10.1139/x01-192>
- Smouse PE, Sork VL (2004) Measuring pollen flow in forest trees: An exposition of alternative approaches. *For Ecol Manag* 197:21-38. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2004.05.049>

- Soltis P S, Soltis DE (2009) The role of hybridization in plant speciation. *Annu Rev Plant Biol* 60:561-588. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.092039>
- Sork VL, Smouse PE (2006) Genetic analysis of landscape connectivity in tree populations. *Landsc Ecol* 21:821-836. <https://doi.org/10.1007/s10980-005-5415-9>
- Sparks TH, Butchart SHM, Balmford A, et al. (2011) Linked indicator sets for addressing biodiversity loss. *Oryx* 45:411-419. <https://doi.org/10.1017/S003060531100024X>
- Stebbins GL, Hartl DL (1988) Comparative evolution: Latent potentials for anagenetic advance. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(14):5141-5145
- Tallmon DA, Luikart G, Beaumont MA (2004) Comparative evaluation of a new effective population size estimator based on approximate Bayesian computation. *Genetics* 167:977-988. <https://doi.org/10.1534/genetics.103.026146>
- UNEP/WCMC (2011) National Indicators, Monitoring and Reporting for the Strategic Plan for Biodiversity 2011-2020
- Vit P, Wolfova K, Urfus T, Tajek P, Suda J (2014) Interspecific hybridization between rare and common plant congeners inferred from genome size data: assessing the threat to the Czech serpentine endemic *Cerastium alsinifolium*. *Preslia* 86:95-117
- Wang Z, Wang L, Liu Z, Li Y, Liu Q, Liu B (2016) Phylogeny, seed trait, and ecological correlates of seed germination at the community level in a degraded sandy grassland. *Front Plant Sci* 17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01532>
- Weir BS (1979) Inferences about linkage disequilibrium. *Biometric* 35(1):235-254. <https://doi.org/10.2307/2529947>
- Whitehead MR, Lanfear R, Mitchell RJ, Karron JD (2018). Plant mating systems often vary widely among populations. *Front Ecol Evol* 6. <https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00038>



Priročnik za gozdni genetski monitoring

poglavje 5

Terensko delo

Darius KAVALIAUSKAS¹, Barbara FUSSI¹, Filippos A. ARAVANOPOULOS², Paraskevi ALIZOTI², Marjana WESTERGRENN³, Marko BAJC³, Rok DAMJANIČ³, Natalija DOVČ³, Ermioni MALLIAROU², Evangelia AVRAMIDOU^{2,4}, Dalibor BALLIAN^{3,5}, Pavlos BEKIAROGLOU⁶, Gregor BOŽIČ³, Andrej BREZNIKAR⁷, Pavlos CHASILIDIS⁶, Anna-Maria FARSAKOGLOU^{2,8}, Domen FINŽGAR^{3,9}, Ioannis GANOPOULOS^{2,10}, Fotios KIOURTSIS⁶, Monika KONNERT¹, Nataša ŠIBANC³, Nikolaos TOURVAS², Hojka KRAIGHERR³

Navedba: Kavaliauskas in sod. (2020) Terensko delo. V: Bajc in sod. (ur.) Priročnik za gozdni genetski monitoring. Gozdarski inštitut Slovenije: Založba *Silva Slovenica*, Ljubljana, str. 47-64. <http://dx.doi.org/10.20315/SFS.168>

Povezane ustanove:

1. Bavarski urad za gozdno genetiko (AWG), Nemčija
2. Aristotelova univerza v Solunu (AUTh), Grčija
3. Gozdarski inštitut Slovenije (GIS), Slovenija
4. Inštitut za sredozemske gozdne ekosisteme, DEMETER, Grčija
5. Univerza v Sarajevu, Fakulteta za gozdarstvo, Bosna in Hercegovina
6. Decentralizirana uprava Makedonije in Trakije, Generalni direktorat za gozdarstvo in podeželje, Grčija
7. Zavod za gozdove Slovenije (ZGS), Slovenija
8. Evropski program varovanja gozdnih genskih virov (EUFORGEN), Evropski inštitut za gozdove (EFI), Španija
9. Inštitut za evolucijsko biologijo, Univerza v Edinburgu, Združeno kraljestvo
10. Inštitut za žlahtnenje in rastlinske genske vire, HAO ELGO DEMETER, Grčija

5.1 Uvod

Poglavje vsebuje podrobna priporočila o tem, kako pripraviti in izvajati redna terenska opazovanja in vzorčenje v okviru sistema gozdnega genetskega monitoringa (GGM), potem ko se izbere in postavi ploskev za GGM. Aktivnosti na vzpostavljene ploskvi so odvisne od ravni GGM (osnovna, standardna ali napredna), v skladu s katero je treba delo redno izvajati (npr. fenološka opazovanja, ocenjevanje mortalitete, ocena obilnosti mladja, vzorčenje itd.). Če želimo zagotoviti medsebojno primerljive rezultate, je treba terensko delo ter tehnike zbiranja podatkov optimizirati in standardizirati, da z njimi dopolnimo in potrdimo informacije, pridobljene z laboratorijskimi analizami. Podrobni opisi postopkov terenskega dela so zato izjemno pomembni za GGM. Terenska opazovanja in vzorčenje za GGM lahko po ustrezni pripravi in usposabljanju izvajajo terenski tehniki, gozdarji ali znanstveniki.

5.2 Verifikatorji in dodatne informacije, ki jih opazujemo/merimo na terenu

Seznam verifikatorjev in dodatnih informacij, ki jih je treba popisati med terenskim delom na različnih ravneh GGM (osnovna, standardna in napredna), je na voljo v Preglednici 5.1 (primer iz smernic za gozdni genetski monitoring za navadno bukev).

Preglednica 5.1: Seznam verifikatorjev in dodatnih informacij, ki jih popisujemo na terenu, s kratkim opisom in pogostostjo opazovanja na ploskvah za monitoring bukke.

Ime	Osnovna raven	Standardna raven	Napredna raven	
Verifikatorji	Mortaliteta/ preživetje	Odrasla drevesa: štetje preostalih označenih dreves vsakih 10 let in po vsakem ekstremnem vremenskem pojavu/motnji	Enako kot osnovna raven	Enako kot osnovna raven
		Mladje: /	Štetje preostalega mladja na podploskvah za monitoring mladja, dvakrat na desetletje	Enako kot standardna raven
	Cvetenje	Ocena na ravni sestoja, vsako leto	Opazovanje na ravni posameznih dreves ob dveh obilnih cvetenjih na desetletje, najbolje v enakomernih časovnih razmikih*	Kot standardna raven, vendar se dodatno opišejo tudi faze razvoja ženskih in moških cvetov*
	Obrod	Ocena na ravni sestoja, vsako leto	Opazovanje na ravni posameznih dreves, v istem letu kot ocena cvetenja na standardni ravni (ne glede na intenzivnost obroda)*	Štetje plodov, v istem letu kot ocena cvetenja na napredni ravni, ne glede na intenzivnost obroda* Za vsak ocenjeni obrod zberemo tudi semena za laboratorijske analize
	Obilnost mladja	Ocena na ravni sestoja, vsako leto	Štetje mladja na podploskvah z mladjem v 1. in 6. letu po vsakem ocenjenem obrodu	Štetje mladja na podploskvah z mladjem v 1. in nato v 6., 11. in 16. letu po vsakem ocenjenem obrodu
Dodatne informacije	Porazdelitev debelinskih razredov	/	Meritev vsakih 10 let	Enako kot standardna raven
	Porazdelitev višinskih razredov	/	Meritev vsakih 10 let	Enako kot standardna raven
	Olistanje	/	Opazovanje na ravni posameznih dreves, vsakih 5 let	Opazovanje na ravni posameznih dreves, vsako leto
	Senescenca	/	Opazovanje na ravni posameznih dreves, vsakih 5 let	Opazovanje na ravni posameznih dreves, vsako leto
	Usklajenost cvetenja	/	/	Opazovanje na ravni posameznih dreves, ob vsakem ocenjenem obilnem cvetenju

* Najbolje je, da vsako desetletje ocenimo vsaj en obilen obrod. Vendar pa vsakemu obilnemu cvetenju ne sledi nujno obilen obrod. Če ocenjenemu cvetenju ne sledi obilen obrod, moramo oceno cvetenja in obroda ponoviti ob naslednjem obilnem cvetenju, ne glede na to, koliko časa preteče med zaporednima obilnima cvetenjema. Obilno cvetenje in obrod prepoznamo z opazovanjem na osnovni ravni.

5.2.1 Verifikator: mortaliteta/preživetje

Sprememba mortalitete ali preživetja (mortaliteta = 1 – preživetje; oba parametra izražena kot delež odmrlih oz. preživelih dreves) **kaže na prisotnost selekcijskega pritiska, tj. odmiranje, kadar je vrednost mortalitete povečana**. Mortaliteta/preživetje se nanaša na število odmrlih/preživelih dreves glede na izhodiščno število (in prejšnjo oceno). Treba je ugotoviti razlog za odmiranje in ga zabeležiti, kadar je to mogoče (ekstremni vremenski pojavi, bolezen, starost itd.). Pri določanju vzroka in obsega odmiranja v primerjavi s širšim območjem se je treba posvetovati z gozdarji (in tako ugotoviti, ali je povečana mortaliteta lokalno omejena ali bolj razširjena).

5.2.1.1 Odrasla drevesa

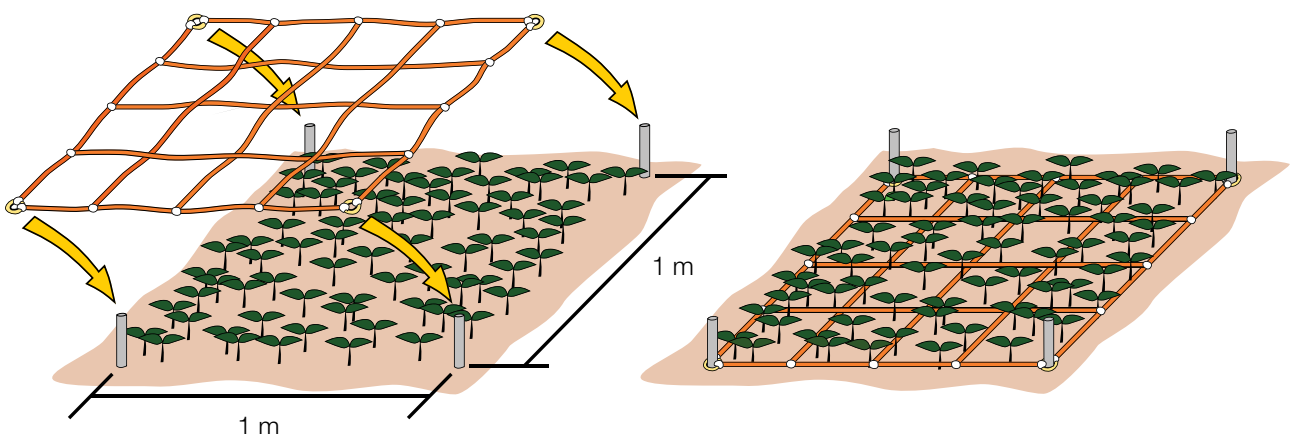
Verifikator za mortaliteto odraslih dreves ocenimo tako, da preštujemo preostala živa označena drevesa vsakih 10 let in po vsakem ekstremnem vremenskem pojavu/motnji. Mortaliteta je razlika med začetnim številom označenih dreves in številom še živih dreves izmed prvotnih 50. Oba parametra se izražata v relativnih enotah, tj. deležu odmrlih oziroma preživelih dreves.

5.2.1.2 Mladje

Mortaliteto/preživetje mladja ocenjujemo samo na standardni in napredni ravni ter jo/ga izračunamo iz ocen verifikatorja Obilnost mladja (razdelek 5.2.2). Mortaliteta je razlika med začetnim številom mladja in številom še živega mladja ob naslednjem štetju. Za vsako ocenjevanje obilnosti mladje najprej preštujemo v letu kalitve in nato 5 let kasneje na standardni ravni, na napredni ravni pa še 10 in 15 let kasneje. Na standardni ravni tako za vsako ocenjevanje izračunamo mortaliteto po petih letih, na napredni ravni pa še po 10 in 15 letih. Obilnost mladja se ocenjuje dvakrat na desetletje, najbolje približno vsakih pet let.

5.2.2 Verifikator: obilnost mladja

Ta verifikator opisuje prisotnost in obilnost mladja na ploskvi za monitoring. Na osnovni ravni ta verifikator popišemo na ravni sestoja, jeseni vsako leto. Za oceno uporabimo strokovno mnenje glede na stanje na celotni ploskvi za monitoring. Zabeležimo dve vrednosti, eno za novo mladje (mladje, ki je vzkliko v letu opazovanja) in eno za starejše mladje (mladje, ki je starejše od enega leta).



Slika 5.1: Štetje rastlin za oceno obilnosti mladja najlažje opravimo s sistemom mreže. Mrežo, sestavljeno iz vrvi ali elastičnih trakov, pritrdimo na označevalne palice v kotih vsake izmed podploskev mladja. Nato preštujemo rastline v vsaki celici mreže posebej in seštejemo številke, da dobimo skupno število za celotno podploskev. Tak pristop poenostavi štetje, saj je tako precej lažje spremljati, katere rastline smo že prešteli in katerih še nismo, kakor če bi šteli rastline na celotni podploskvi z mladjem.

Na standardni in napredni ravni ta verifikator popišemo s štetjem mladja na vsaki od 20 podploskev za monitoring mladja. Štetje začnemo prvo jesen po kalitvi po ocenjenem obrodu in ga ponovimo 5. jesen na standardni ravni ter 5., 10. in 15. jesen na napredni ravni. Čas, ki preteče od obroda do kalitve, je odvisen od dormance semen posamezne vrste. Prvo jesen po kalitvi moramo prešteti vse mladje starosti do enega leta na vsaki izmed 20 podploskev z mladjem. Starejšega mladja prvo jesen ne štejemo. Pri naslednjem štetju štejemo samo mladje ustrezne starosti – v 5. letu štejemo 5-letno mladje.

Na vsaki podploskvi za monitoring mladja, veliki 1 m², lahko raste veliko mladja, zato je za lažje štetje priporočljivo uporabiti »pristop mreže« – tj. razdeliti podploskev naravnega mladja na manjše kvadrate. To lahko preprosto in učinkovito naredimo tako, da sestavimo mrežo iz vrvice ali elastičnih trakov, njena oglišča pa pritrdimo na kovinske palice, ki se uporabljajo za označevanje podploskev z mladjem (Slika 5.1; podpoglavje 3.2.3.2).

5.2.3 Dodatne informacije: porazdelitev debelinskih razredov

Prsni premer (v centimetrih) se izmeri v višini 1,3 metra od tal, tj. približno v višini prsi odraslega človeka, vedno pravokotno na os drevesnega debla, pri tem pa uporabimo premerko ali merilni trak oz. pi-meter. V primeru slednjega izmerimo obseg drevesa in nato izračunamo premer oz. v primeru pi-metra prsni premer lahko odčitamo iz samega traku. Če uporabljamo premerke, moramo opraviti dve meritvi pravokotno eno na drugo, nato izračunamo povprečje, da upoštevamo drevesa z asimetričnim presekom. Če ima drevo več debel, izmerimo premere vseh posameznih debel, nato izračunamo in zapišemo povprečje. V takih primerih je treba zabeležiti, da ima drevo več debel. Na nagnjenih terenih se prsni premer izmeri na tisti strani, ki je na višji točki pobočja. Porazdelitev debelinskih razredov se oceni kot sestavni del opisne statistike podatkov o sestoji.

Oprema, ki jo potrebujemo za meritve prsnega premera:

- premerka ali merilni trak (pi-meter).

5.2.4 Dodatne informacije: porazdelitev višinskih razredov

Višino (v metrih z eno decimalno) izmerimo od tal do najvišjega dela krošnje s hipsometrom ali klinometrom, za nizka drevesa pa lahko uporabimo teleskopsko palico.

Oprema, ki jo potrebujemo za meritve višine:

- Višinomer (npr. Vertex)/trak za meritve višine,
- teleskopska merilna palica (za nizka drevesa).

5.3 Fenološka opazovanja

5.3.1 Uvod v fenologijo

Fenologija je proučevanje časa pojavljanja bioloških dogodkov pri rastlinah, na primer cvetenja in olistanja. Na fenološke lastnosti vplivajo številni okoljski (npr. potrebno obdobje hladnega vremena, temperaturna vsota itd.) in fiziološki dejavniki, nujni za začetek procesov, vendar ima pomemben vpliv tudi genetska komponenta (Ducci in sod. 2012). Informacije o času in trajanju posameznih fenoloških dogodkov (olistanja, cvetenja, senescence listov itd.) so pomembne za razumevanje dejanskega stanja populacij in posameznih dreves v spreminjajočem se okolju. Časovne spremembe fenoloških dogodkov se lahko pojavijo zaradi različnih dejavnikov, npr. nestalnega podnebja in podnebnih sprememb ali drugih okoljskih vplivov, to pa vpliva ne samo na stanje posameznih dreves, ampak tudi na ekološke procese (npr. sistem opraveševanja) na ravni sestoji in populacije (Beuker in sod. 2010). Podatki o fenoloških fazah (tj. fenofazah) olistanja, cvetenja, senescence listov itd. so nujni za celovite ocene različnih vidikov v okviru gozdnega genetskega monitoringa. Sposobnost vrste, da se s spremembami v fenologiji dolgoročno prilagodi abiotičnim okoljskim razmeram, je mogoče šteti za kazalnik njene občutljivosti za prihodnje podnebne spremembe. Glavni cilj fenoloških opazovanj na ploskvah za gozdni genetski monitoring je zagotoviti

dodatne informacije o stanju in razvoju fenoloških lastnosti v zvezi z rastjo populacije gozdnih dreves med letom. Podatki, pridobljeni med fenološkimi opazovanji, nam pomagajo ugotavljati stanje in potek letnih razvojnih faz populacije gozdnih dreves ter njihovo odvisnost od različnih okoliščin. Pomembno je odkrivati trende in morebitne dejavnike (naravne in/ali antropogene), ki spreminjajo čas ter trajanje fenoloških faz (čas začetka, trajanje in jakost) (Beuker in sod. 2010). Spremembe fenologije vrst lahko tako povzročijo motnje v ekosistemskih procesih in prizadanejo tudi storitve, s katerimi se ljudje preživljajo.

5.3.2 Fenološki verifikatorji in dodatne informacije

5.3.2.1 Verifikator: cvetenje

Fenologija cvetenja je proučevanje časovnega poteka razvoja moških in ženskih cvetov s popisom različnih fenoloških faz (Ducci in sod. 2012). Fenologija cvetenja je ključni dejavnik, ki vpliva na reproduktivno sposobnost dreves z izmenjavo genov med genotipi, ta izmenjava pa določa genetsko variabilnost proizvedenega semena in posledično uspešnost preživetja mladja, ki iz tega semena vzkljuje (Alizoti in sod. 2010).

Postopki fenoloških opazovanj temeljijo na sistemu točkovanja, ki ga upoštevamo pri ocenjevanju razvojnih faz (fenoloških faz) moških in ženskih cvetov od spečih cvetnih brstov do polno razvitih cvetov/storžkov/strobilov. Fenološka opazovanja upoštevajo fenološko fazo (fenofazo), del drevesne krošnje, ki jo popisujemo (zgornji, srednji, spodnji), in smer opazovanj (S – sever; SV – severovzhod; V – vzhod; JV – jugovzhod; J – jug; JZ – jugozahod; Z – zahod; SZ – severozahod; VSE – okoli celotne krošnje). Podatki se uporabljajo za pripravo fenogramov, ki kažejo začetek, trajanje in konec pojava. Ta verifikator opisuje prisotnost cvetenja (delež dreves) in intenzivnost cvetenja.

Postopki za oceno cvetenja na različnih ravneh gozdnega genetskega monitoringa:

5.3.2.1.1 Osnovna raven

Ta verifikator popišemo vsako leto na ravni sestoja na podlagi strokovnega mnenja. Popis opravimo, ko je cvetenje v polnem zamahu. Povprečno stanje ocenimo po obhodu celotne ploskve za monitoring. Zabeležimo dva rezultata, enega za jakost cvetenja in drugega za delež cvetočih dreves v sestoji (glejte spodnji preglednici).

Šifra	Jakost cvetenja na ravni sestoja	Povprečni delež krošnje s cvetovi (%)
1	Brez cvetenja: na drevesih ni cvetov ali so cvetovi le ponekod	0–10
2	Šibko cvetenje: na drevesih je nekaj cvetov	> 10–30
3	Zmerno cvetenje: na drevesih je zmerno število cvetov	> 30–60
4	Močno cvetenje: na drevesih je veliko število cvetov	> 60–90
5	Masivno cvetenje: na drevesih je ogromno število cvetov	> 90

Šifra	Delež dreves v sestoji z navedeno jakostjo cvetenja (%)
1	0–10
2	> 10–30
3	> 30–60
4	> 60–90
5	> 90

5.3.2.1.2 Standardna raven

Ta verifikator popišemo ob dveh obilnih cvetenjih na desetletje, najbolje v enakomernih časovnih razmikih. Popišemo ga na podlagi strokovnega mnenja na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves. Cvetenje je obilno, ko je na osnovni ravni ocenjeno kot močno ali masivno (šifra 4 ali 5) in je delež dreves z

navedeno stopnjo jakosti cvetenja večji od 60 % (šifra 4 ali 5). Popis opravimo, ko je cvetenje v polnem zamahu. Za vsako drevo navedemo en rezultat (glejte spodnjo preglednico).

Podroben opis postopka:

1. Fenološka opazovanja cvetenja se izvedejo za izbrana in označena drevesa (50 dreves na ploskev).
2. Opazovanja je treba opraviti ločeno za vsako posamezno drevo ob uporabi daljnogledov ali digitalnih fotografij.
3. O opazovanem delu krošnje je treba poročati na opisnem obrazcu (1. zgornji/2. srednji/3. zgornji in srednji del krošnje). Oceniti je treba celotno krošnjo ali njen najvišji del (zgornji), če je to mogoče.
4. O smeri krošnje, za katero so bila opravljena opazovanja, je treba poročati na opisnem obrazcu (S – sever; SV – severovzhod; V – vzhod; JV – jugovzhod; J – jug; JZ – jugozahod; Z – zahod; SZ – severozahod; VSE – okoli celotne krošnje).
5. Če je viden samo del krošnje iz neke smeri, je treba pri nadaljnjih fenoloških opazovanjih to leto in vsa nadaljnja leta obravnavati isti del krošnje in isto smer opazovanja.
6. Cvetenje je treba opazovati redno enkrat na teden. Pri nekaterih drevesnih vrstah se lahko opazovanja prekrivajo s fenologijo olistanja.
7. Različne drevesne vrste lahko začnejo cveteti ob različnem času glede na biologijo vrste in okoljske razmere.

Šifra	Jakost cvetenja	Delež krošnje s cvetovi (%)
1	Brez cvetenja: na drevesu ni cvetov ali so cvetovi le ponekod	0–10
2	Šibko cvetenje: na drevesu je nekaj cvetov	> 10–30
3	Zmerno cvetenje: na drevesu je zmerno število cvetov	> 30–60
4	Močno cvetenje: na drevesu je veliko število cvetov	> 60–90
5	Masivno cvetenje: na drevesu je ogromno število cvetov	> 90

5.3.2.1.2 Napredna raven

Ta verifikator popišemo ob dveh obilnih cvetenjih na desetletje, najbolje v enakomernih časovnih razmikih. Popišemo ga na podlagi strokovnega mnenja na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves. Cvetenje je obilno, ko je na osnovni ravni ocenjeno kot močno ali masivno (šifra 4 ali 5) in je delež dreves z navedeno stopnjo intenzivnosti cvetenja večji od 60 % (šifra 4 ali 5). Povprečno sta potrebna dva obiska ploskve; prvi dovolj zgodaj, da opazujemo zgodnje faze cvetenja, in drugi, ko je cvetenje v polnem razmahu. Poleg intenzivnosti cvetenja na ravni posameznih dreves, se na napredni ravni beleži tudi faza razvoja ženskih in moških cvetov.

Faze razvoja cvetov se za različne drevesne vrste razlikujejo. V smernicah za gozdni genetski monitoring (9. poglavje: Smernice za gozdni genetski monitoring) so navedene in ilustrirane faze razvoja ženskih in moških cvetov za vsako obravnavano vrsto.

Šifra	Delež krošnje s cvetovi (%; moško in žensko cvetenje skupaj)
1	0–10
2	> 10–30
3	> 30–60
4	> 60–90
5	> 90

5.3.2.2 Verifikator: obrod

Jakost in periodičnost obroda med zaporednimi semenskimi leti sta značilni za posamezno vrsto in se spreminjata glede na vremenske razmere, razpoložljivost virov, obilnost oprasovalcev v primeru anemofilnih vrst in genetski nadzor (Mund in sod. 2010 ter tam navedena literatura in viri). Začetek obroda je pomemben znak za drevo, saj kaže na njegovo reproduktivno zrelost in na to, da bo del virov, ki so bili do takrat v celoti namenjeni vegetativni rasti in obrambi, od takrat namenjen reprodukciji (Seifert in Müller-Starck 2009).

Postopki fenoloških opazovanj temelji na sistemu točkovanja, ki ga uporabimo pri ocenjevanju obroda. Pri fenoloških opazovanjih se upoštevata periodičnost in jakost obroda. Podatki se glede na raven monitoringa (osnovna/standardna/napredna) zbirajo na ravni sestoja ali za posamezno drevo. Ta verifikator opisuje prisotnost obroda in njegovo obilnost.

Postopki za oceno obroda na različnih ravneh gozdnega genetskega monitoringa:

5.3.2.2.1 Osnovna raven

Ta verifikator popišemo vsako leto na ravni sestoja. Povprečno stanje ocenimo po obhodu ploskve za monitoring. Zabeležimo dve vrednosti, eno za intenzivnost obroda in drugo za delež dreves v sestoji, ki so obrodila.

Šifra	Jakost obroda na ravni sestoja	Povprečni delež krošnje s plodovi (%)
1	Brez obroda: na drevesih ni plodov ali pa so prisotni v zelo majhnem številu	0–10
2	Šibek obrod: na drevesih je nekaj plodov	> 10–30
3	Zmeren obrod: na drevesih je zmerna količina plodov	> 30–60
4	Močen obrod: na drevesih je veliko plodov	> 60–90
5	Masiven obrod: na drevesih je ogromno plodov	> 90

Šifra	Delež dreves v sestoji z navedeno jakostjo obroda (%)
1	0–10
2	> 10–30
3	> 30–60
4	> 60–90
5	> 90

5.3.2.2.2 Standardna raven

Ta verifikator za večino vrst popišemo v istih letih kot oceno cvetenja na standardni ravni (ne glede na jakost obroda). Izjema so npr. vrste borov, pri katerih se dozorevanje storžev in sproščanje semen pojavi drugo leto po cvetenju. Zaželjeno je, da v popisih zajamemo dva obroda na desetletje in da je vsaj eden od teh obilen. Popišemo ga na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves.

Podroben opis postopka:

1. Opazovanja obroda se izvedejo za izbrana in označena drevesa (50 dreves na ploskev).
2. Opazovanja je treba opraviti ločeno za vsako posamezno drevo ob uporabi daljnogleda in pri tem oceniti odstotek krošnje s plodovi/zrelimi storži (glejte spodnjo preglednico).
3. Kateri del krošnje smo opazovali je treba zabeležiti na opisnem obrazcu (Excelova datoteka) (1. zgornji/2. srednji/3. zgornji in srednji del krošnje). Oceniti je treba celotno krošnjo ali vsaj njen najvišji del (zgornji), če je to mogoče.

4. O smeri krošnje, za katero so bila opravljena opazovanja, je treba poročati na opisnem obrazcu (S – sever; SV – severovzhod; V – vzhod; JV – jugovzhod; J – jug; JZ – jugozahod; Z – zahod; SZ – severozahod; VSE – okoli celotne krošnje).
5. Če je viden samo del krošnje iz neke smeri, je treba pri nadaljnjih fenoloških opazovanjih v nadaljnjih letih obravnavati isti del krošnje in iz iste smeri opazovanja.
6. Za oceno obroda je potreben en obisk ploskve, ki ga je obvezno treba opraviti pred odpadanjem ali sproščanjem semen/plodov.

Šifra	Jakost obroda	Delež krošnje s plodovi (%)
1	Brez obroda: na drevesu ni plodov ali pa so prisotni v zelo majhnem številu	0–10
2	Šibek obrod: na drevesu je nekaj plodov	> 10–30
3	Zmeren obrod: na drevesu je zmerna količina plodov	> 30–60
4	Močen obrod: na drevesu je veliko plodov	> 60–90
5	Masiven obrod: na drevesu je ogromno plodov	> 90

5.3.2.2.3 Napredna raven

Ta verifikator popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves v istih letih kot oceno cvetenja na napredni ravni, ne glede na jakost obroda. Verifikator popišemo tako, da skozi daljnogled preštejemo plodove, kar moramo storiti pred začetkom odpadanja plodov. Uporabimo povprečni rezultat treh zaporednih štetij. Rezultat vsakega štetja je število plodov, ki jih opazovalec lahko prešteje v 30 sekundah. Pri vseh drevesih moramo preučevati isti del krošnje. Ko izberemo del krošnje, ki ga bomo opazovali, moramo ob vsakem naslednjem spremljanju tega verifikatorja izbrati isti del krošnje. Zgornja tretjina krošnje je za štetje ustrežnejša od spodnjega in srednjega dela.

Zabeležimo dve vrednosti, število plodov in opazovani del krošnje.

Najbolje je, da po opaženih obilnih cvetenjih zajamemo vsaj en obilen obrod na desetletje. Vendar pa vsakemu obilnemu cvetenju ne sledi nujno obilen obrod. Če ocenjenemu cvetenju ne sledi obilen obrod, moramo oceno cvetenja in obroda ponoviti ob naslednjem obilnem cvetenju, ne glede na to, koliko časa preteče med zaporednima obilnima cvetenjema. Obilen obrod prepoznamo z opazovanjem na osnovni ravni. Obrod je obilen, ko je na osnovni ravni ocenjen kot močen ali masiven (šifra 4 ali 5) in je delež dreves z navedeno stopnjo jakosti obroda večji od 60 % (šifra 4 ali 5).

Število plodov, prešteti v 30 sekundah (povprečje 3 štetij)

X

Šifra Opazovani del krošnje

1 Spodnji

2 Srednji

3 Zgornji

5.3.2.3 Dodatne informacije: olistanje

Olistanje je obdobje od spečega brsta do faze dolžinske rasti poganjkov. Informacije o času in trajanju olistanja so pomembne za razumevanje dejanskega stanja posameznih dreves in populacij gozdnih dreves v spreminjajočem se okolju.

Postopki fenoloških opazovanj olistanja temelji na sistemu točkovanja, ki ga uporabimo pri ocenjevanju razvojnih/fenoloških faz od spečega brsta do dolžinske rasti poganjkov. Pri fenoloških opazovanjih se upoštevata faza in

delež krošnje z razvijajočimi se listi. Olistanje opisuje razvoj mladih listov. Popis te dodatne informacije izvajamo samo na standardni in napredni ravni.

Postopki za oceno olistanja na različnih ravneh gozdnega genetskega monitoringa:

5.3.2.3.1 Standardna raven

Na standardni ravni olistanje popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves vsakih 5 let. Za vsako drevo zabeležimo dve oceni: faza olistanja in delež krošnje z razvijajočimi se listi. Za grafični prikaz in sistem točkovanja faz olistanja glejte smernice za gozdni genetski monitoring obravnavanih vrst (9. poglavje).

Podroben opis postopka:

1. Opazovanja olistanja je treba izvesti za izbrana in označena drevesa (50 dreves na ploskev).
2. Opazovanja je treba opraviti ločeno za vsako posamezno drevo ob uporabi daljnogleda ali digitalne fotografije.
3. O opazovanem delu krošnje je treba poročati na opisnem obrazcu (1. zgornji/2. srednji/3. zgornji in srednji del krošnje). Oceniti je treba celotno krošnjo ali njen najvišji del (zgornji), če je to mogoče.
4. O smeri krošnje, za katero so bila opravljena opazovanja, je treba poročati na opisnem obrazcu (S – sever; SV – severovzhod; V – vzhod; JV – jugovzhod; J – jug; JZ – jugozahod; Z – zahod; SZ – severozahod; VSE – okoli celotne krošnje).
5. Če je viden samo del krošnje iz neke smeri, je treba pri nadaljnjih fenoloških opazovanjih to leto in vsa nadaljnja leta obravnavati isti del krošnje iz iste smeri opazovanja.
6. Napredek olistanja je treba opazovati redno (enkrat na teden) med celotnim obdobjem olistanja (trajanje sezone olistanja je odvisno od biologije ciljne drevesne vrste in okoljskih razmer).
7. Olistanje je treba začeti opazovati dovolj zgodaj, da zajamemo najzgodnješe faze, ko lahko popišemo pomembne razlike na ravni posameznih dreves.
8. Opazovanja se končajo, ko vsa izbrana drevesa dosežejo zadnjo fazo (število in opisi posameznih faz se med vrstami razlikujejo). Popisati je treba fazo (fenofazo), v kateri je olistanje najbolj napredovalo.

Šifra	Delež krošnje z navedeno fazo olistanja (%)
1	> 0–33
2	> 33–66
3	> 66–99
4	100

5.3.2.3.2 Napredna raven

Na napredni ravni olistanje popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves vsako leto. Vrednosti (faza olistanja in delež krošnje s to fazo olistanja) so v razdelku 5.3.2.3.1, Standardna raven.

5.3.2.4 Dodatne informacije: senescenca

Senescenca listja je pomembna lastnost, ki lahko vpliva na dolžino rastne dobe tistih vrst, ki jim jeseni odpadejo listi, nanj pa zelo vplivajo okoljski in genetski dejavniki. Informacije o času in trajanju fenologije senescence listov so pomembne za razumevanje dejanskega stanja posameznih dreves in populacij gozdnih dreves v spreminjajočem se okolju.

Postopki fenoloških opazovanj senescence listov temeljijo na sistemu točkovanja, ki ga upoštevamo pri ocenjevanju senescence listov. Podatki se zbirajo na ravni sestoja ali za posamezno drevo. Popis te dodatne informacije opravimo samo na standardni in napredni ravni. Pri fenoloških opazovanjih se upoštevata faza in delež krošnje v tej fazi senescence.

Postopki za oceno fenologije senescence listov

5.3.2.4.1 Standardna raven

Na standardni ravni senescenco popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves vsakih 5 let. Za vsako drevo zabeležimo dve oceni: faza senescence in delež krošnje v tej fazi senescence. Za grafični prikaz faz senescence glejte smernice za gozdni genetski monitoring obravnavanih drevesnih vrst (9. poglavje).

Podroben opis postopka:

1. Opazovanja senescence listov se izvedejo za izbrana in označena drevesa (50 dreves na ploskev).
2. Opazovanja je treba opraviti ločeno za vsako posamezno drevo ob uporabi daljnogleda ali po potrebi digitalne fotografije visoke ločljivosti.
3. O opazovanem delu krošnje je treba poročati na opisnem obrazcu (1. zgornji/2. srednji/3. zgornji in srednji del krošnje). Oceniti je treba celotno krošnjo ali njen najvišji del (zgornji), če je to mogoče.
4. O smeri krošnje, za katero so bila opravljena opazovanja, je treba poročati na opisnem obrazcu (S – sever; SV – severovzhod; V – vzhod; JV – jugovzhod; J – jug; JZ – jugozahod; Z – zahod; SZ – severozahod; VSE – okoli celotne krošnje).
5. Če je viden samo del krošnje iz neke smeri, je treba pri nadaljnjih fenoloških opazovanjih to leto in vsa nadaljnja leta obravnavati isti del krošnje in iz iste smeri opazovanja.
7. Senescenco je treba oceniti dva- do trikrat na sezono (čas in trajanje opazovanj senescence listov sta odvisna od biologije vrste in okoljskih razmer).
8. Velja, da je zadnja faza (4. faza) dosežena, ko se vsaj en list (vključno s tistimi, ki so pred kratkim odpadli z rastline) obarva v barvo, značilno za pozno sezono. Popolnoma posušeni ali mrtvi listi, ki ostanejo na rastlini, se ne upoštevajo. Opazovanja prekinemo, ko vsi listi dosežejo 3. fazo senescence – listi se obarvajo rumeno in prenehajo fotosintetizirati.
9. Delež listov v vidnem delu krošnje, ki so v opisani fazi ali so že presegli to fazo, je treba popisati ob upoštevanju klasifikacije faz senescence listov.

Šifra Faza senescence

1	Listi/iglice so zeleni
2	Listi/iglice so zelene barve, ki se spreminja v rumeno (zelenkasto rumena)
3	Listi/iglice so rumene barve, ki se spreminja v rjavo (rjavkasta)
4	Listi/iglice so rjavi/odpadli

Šifra Delež krošnje z navedeno fazo senescence (%)

1	> 0–33
2	> 33–66
3	> 66–99
4	100

5.3.2.4.2 Napredna raven

Senescenco popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves vsako leto. Vrednosti (faza senescence in delež krošnje v tej fazi) so v razdelku 5.3.2.4.1, Standardna raven.

5.3.2.5 Dodatne informacije: sinhronizacija cvetenja

Sinhronizacija cvetenja je del fenologije cvetenja, ki se posveča času razvoja moškega in ženskega cveta s popisom različnih fenoloških faz (Ducci in sod. 2012). Sinhronizacijo cvetenja spremljamo samo na napredni ravni na podlagi podatkov, zbranih za verifikator Cvetenje (glejte 5.3.2.1). S to informacijo ugotavljamo, ali je cvetenje moških in ženskih cvetov v spremljanem sestoju časovno usklajeno.

5.3.2.5.1 Napredna raven

Sinhronizacijo cvetenja popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves ob vsakem ocenjenem obilnem cvetenju v istih letih, kot zbiramo seme za večino vrst (enako kot Cvetenje na napredni ravni).

5.4 Vzorčenje

5.4.1 Postopek vzorčenja za analizo DNK

Vzorčenje je sestavni del gozdnega genetskega monitoringa. Zato potrebujemo standardizirane postopke vzorčenja, da zagotovimo najboljše rezultate, pridobljene z analizo DNK. Postopki vzorčenja, oprema in materiali, ki jih potrebujemo za vzorčenje, so opisani v tem poglavju. Predstavljeni so primeri, značilni za posamezne vrste, in nasveti za vzorčenje (npr. primeren material, ki ga lahko vzorčimo, posebnosti nabiranja semen za testiranje semena itd.).

Oprema, ki jo potrebujemo za vzorčenje:

- plastične/papirnate vrečke za vzorce (100 vrečk za 50 vzorcev odraslih osebkov in 50 vzorcev mladja);
- škarje/obrezovalniki ali nož za veje;
- plastične nalepke/aluminijaste oznake;
- električni baterijski vrtalnik, dodatne baterije;
- sveder s premerom od 6 do 10 milimetrov, dodatni svedri;
- 0,5-litraska izpiralka z destilirano vodo, dodatnih 5 litrov destilirane vode;
- destilirana voda za čiščenje svedra;
- bombažne vrečke ali posode za semena/storže;
- plastične vrečke s silikagelom za sušenje vzorcev med vzorčenjem in transportom;
- vodoodporna pisala;
- posode iz stiropora ali druge toplotno izolirane posode s hladilnim vložkom za zaščito vzorcev pred prevelikimi temperaturnimi nihanjem.

5.4.1.1 Vzorčenje odraslih dreves

Vzorčiti je treba vsa označena drevesa na ploskvi (50 odraslih dreves za enodomne vrste; 25 ženskih in 25 moških dreves za dvodomne ali funkcionalno dvodomne vrste). Material z vsakega drevesa je treba hraniti v ločeni plastični/papirnati/bombažni vrečki. Pri hibridizirajočih vrstah in vrstah z vegetativnim razmnoževanjem (klonih)

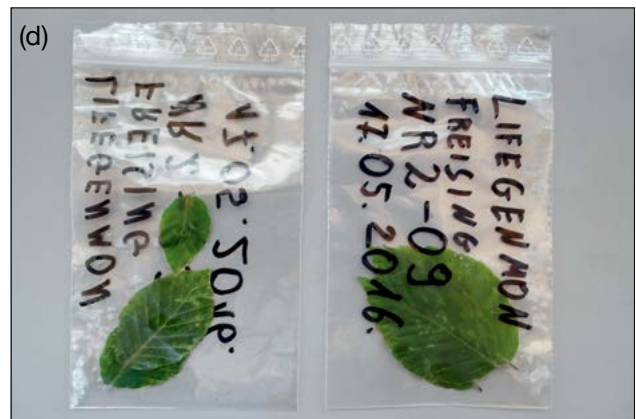
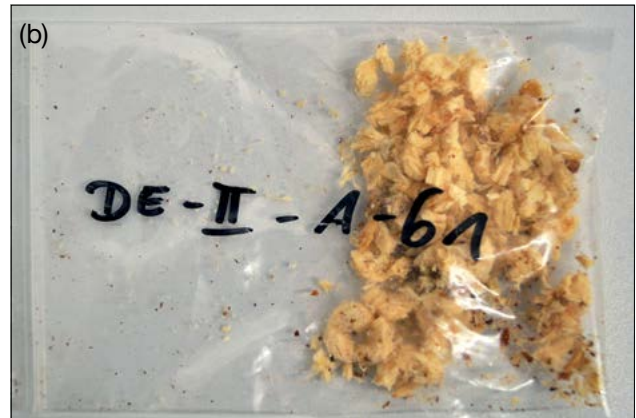
je priporočljivo vzorčiti in genotipizirati večje začetno število odraslih dreves (npr. 100, glejte Preglednico 5.2), saj lahko v monitoring vključimo samo osebkke čiste vrste in samo po en osebek z istim genotipom. Če začetna analiza DNK pokaže zelo visok odstotek hibridizacije, je treba za gozdni genetski monitoring poiskati drug sestoj (razen če ni namen raziskave prav monitoring hibridnega sestoja).

Komentar k številu vzorčenih dreves pri dvodomnih vrstah:

Potrebno je opozoriti, da 25 ženskih in 25 moških dreves pri dvodomnih ali funkcionalno dvodomnih vrstah predstavlja zgolj polovico skupnega števila možnih staršev, ki prispevajo k naslednji generaciji, v primerjavi s 50 odraslimi enodomnimi drevesi. Odločitev, da se za enodomne in dvodomne vrste vzorči enako število odraslih razmnoževalno aktivnih dreves, izvira predvsem iz praktičnih razlogov, tj. v izogib povečanju delovnih obremenitev in stroškov zaradi spremljanja 100 dreves (zlasti iz naslova fenoloških opazovanj), kot tudi prekomernemu povečanju ploskve za monitoring.

Primeren material za vzorčenje za genetsko analizo je lahko naslednji (Slika 5.2: a, b, c, d):

- veje z brsti (2–3 veje na drevo, dolge 5–10 centimetrov z 1 ali 2 brstoma), odrezane s škarjami ali nožem;
- sveži listi/iglice (5–10 svežih listov/iglic z vsakega drevesa);
- les s kambijem, odvzet z vrtanjem 4 centimetre globoko v vsako drevo (z električnim baterijskim vrtalnikom, s katerim napolnimo 2-mililitrsko mikrocentrifugirko, ali s prirastnim svedrom, s katerim izvrtamo dva 3-centimetrska lesna izvrtka).



Slika 5.2: Rastlinski material za genetsko analizo (a in b – les s kambijem; c in d – sveži listi ali iglice).

Med zgoraj navedenimi možnostmi izberemo vrsto materiala, ki ga je lažje nabrati. Vzorčeni material za genetsko analizo je lahko kombinacija več vrst tkiva, npr. brstov, svežih listov ali lesa s kambijem. V določenih primerih je pred začetkom vzorčenja treba pridobiti lastnikovo dovoljenje za odvzem materiala, ki ga bomo vzorčili (npr. če bomo vrtali). Listavci so občutljivejši za vzorčenje z vrtnjem, zato je priporočljivo uporabiti manj invazivne pristope, če je mogoče (listi, vejice z brsti). Pri listavcih je odvzem vzorcev z vrtnjem najprimerneje izvesti med januarjem in marcem (zunaj vegetacijskega obdobja), saj se rane takrat hitreje celijo. Če želimo preprečiti škodljive vplive na kakovost debla, je najbolje vrtati v najnižji del debla čim bližje tlom. Pri iglavcih je vrtnje manj problematično, saj se rane, ki nastanejo zaradi vrtnja, zelo hitro zapolnijo s smolo.

Vrečke z materialom za analizo DNK je treba sistematično in dosledno označevati. Pri projektu LIFEGENMON smo se dogovorili, da bomo vzorce označevali tako: SI-I-FSY-A-01

DE – koda države (npr. SI – Slovenija);

I – številka ploskve/sestoja;

FSY – latinsko ime vrste, v prikazanem primeru *Fagus sylvatica*;

A – odrasel (iz angl.: adult);

01 – številka drevesa od 1 do 50.

Vse vrste vzorcev je priporočljivo vstaviti v izolirane posode (na primer posode iz stiropora, ki se uporabljajo za prevoz temperaturno občutljivih materialov) s hladilnim vložkom, da na terenu in med transportom preprečimo prevelika temperaturna nihanja.

5.4.1.2 Vzorčenje mladja

Mladje je treba vzorčiti na 20 podploskvah z mladjem (neposredno poleg 1 m² velike ploskve za oceno obilnosti/preživetja) tretje leto po kalitvi (3-letne rastline). Zbere se petdeset vzorcev mladja: 3 rastline z 10 naključno izbranih podploskev z mladjem, po 2 s preostalimi 10 podploskev. Za hibridizirajoče vrste in vrste z vegetativnim razmnoževanjem (kloni) je treba vzorčiti in genotipizirati 100 vzorcev mladja. Odstotek hibridizacije se izračuna iz rezultatov za vseh 100 vzorcev, nato se naključno izbere 50 nehibridiziranih osebkov z edinstvenimi genotipi za izračun drugih molekularno genetskih verifikatorjev in dodatnih informacij.

Material mladja, primeren za ekstrakcijo DNK:

- veje z brsti (2 ali 3 veje na osebek, dolge 3 do 5 centimetrov z 1 ali 2 brstoma), odrezane s škarjami/obrezovalniki ali nožem za veje;
- sveži listi/iglice (odtrgajte 2 do 5 svežih listov z vsakega osebkov).

Priporočilo: količino rastlinskega materiala lahko za ekstrakcijo DNK zmanjšate; za ekstrakcijo DNK je običajno dovolj vzorčiti 2 ali 3 brste/liste. Vendar je vedno bolje imeti na voljo nekaj brstov več za ponovitve v laboratoriju in rezervo za morebitne ponovitve analiz v prihodnosti. Material z vsakega drevesa je treba hraniti v ločeni plastični/papirnati/bombažni vrečki.

Vrečke je treba sistematično in dosledno označevati. Pri projektu LIFEGENMON smo se dogovorili, da bomo vzorce naravnega mladja označevali tako: SI-I-FSY-NR-01

SI – koda države (npr. SI – Slovenija);

I – številka ploskve/sestoja;

FSY – latinsko ime vrste, v tem primeru *Fagus sylvatica*;

NR – naravno mladje (iz angl.: natural regeneration);

01 – številka drevesa od 1 do 50.



Slika 5.3: Nabiranje storžev bele jelke (Nemčija).



Slika 5.4: Zbrana semena/storži (navadna bukev in bela jelka).

5.4.1.3 Vzorčenje semena

Semena potrebujemo za analizo DNK in testiranje semena na napredni ravni monitoringa.

Čas nabiranja semen se razlikuje od države do države ter je odvisen od biologije ciljne drevesne vrste in okoljskih/podnebnih razmer posameznega območja. Na primer pri beli jelki (*Abies alba*) se semena v srednji Evropi običajno začnejo nabirati ob koncu avgusta, v južni Evropi pa med septembrom in oktobrom. Semena navadne bukve (*Fagus sylvatica*) se običajno nabirajo od septembra do novembra.

- Semena je treba nabrati z 20 izbranih semenskih dreves in vzorčiti je treba vsaj 200–300 semen na materinsko drevo z več različnih vej (na voljo mora biti večje število semen, da zagotovimo, da imamo zadostno število polnih semen), 20 polnih semen na drevo se uporabi za analizo DNK, skupno 400 semen za vsa testirana semenska drevesa na oceno. Pri hibridizirajočih vrstah se za analizo DNK uporabi 30 polnih semen na drevo; odstotek hibridizacije se izračuna iz rezultatov za vseh 600 semen, nato se naključno izbere 400 nehibridnih semen za izračun drugih molekularno genetskih verifikatorjev in dodatnih informacij.
- Semena navadne bukve je treba nabrati tako, da splezamo na drevesa, (po potrebi) odrežemo več vej in nabereмо plodove, ki vsebujejo semena, neposredno z vej.
- Semena bele jelke je treba nabrati tako, da splezamo na drevesa in nabereмо storže pred fazo odpiranja lusk (ko so luske storžev zaprte in so semena še vedno v storžu) (Slika 5.3).
- Semena z različnih materinskih dreves je treba hraniti v ločenih bombažnih vrečkah ali posodah, ki morajo biti jasno in nedvoumno označene (Slika 5.4).
- Vrečke je treba sistematično in dosledno označevati. Pri projektu LIFE GENMON smo se dogovorili, da bomo vzorce semen označevali tako: SI-I-FSY-ST-X

SI – koda države (npr. SI – Slovenija);

I – številka ploskve/sestoja;

FSY – latinsko ime vrste, v tem primeru *Fagus sylvatica*;

ST – semensko drevo;

X – številka drevesa, označena na semenskem drevesu (ohraniti je treba iste številke, kot so bile določene pri izbiranju odraslih dreves).

Ves rastlinski material, zbran za analizo DNK, se hrani pri temperaturi približno 2–3 °C (ne zamrznjeno/ne pri manj kot 0 °C) največ 3 dni, nato se ga čim prej pošlje v laboratorij na analizo DNK. Za transport semen in storžev v laboratorij za analizo DNK je na voljo več časa, saj ni tveganja degradacije DNK.

5.4.2 Vzorčenje semena za testiranje semena

Skladno s pravili ISTA (2020) je cilj vzorčenja semena pridobiti dovolj velik vzorec za testiranje semena. Vzorec za testiranje semena v okviru gozdnega genetskega monitoringa na ploskvi za genetski monitoring pridobimo tako, da naključno nabereмо majhne količine semena na različnih mestih, nato pa vsa semena zmešamo, da dobimo skupni vzorec (velja za vrste kjer je nabiranje semena s tal praktično izvedljivo). Vsaka faza vzorčenja mora biti izvedena z ustreznimi metodami in opremo. V tem poglavju opisujemo postopek vzorčenja težkega in lahkega (raznašanje z vetrom) semena za testiranje semena ciljnih drevesnih vrst v okviru gozdnega genetskega monitoringa.

5.4.2.1 Vzorčenje za testiranje semena vrst s težkim semenom (npr. *Fagus* spp., *Quercus* spp.)

Težka semena nekaterih vrst, na primer *Fagus* spp. in *Quercus* spp., je treba nabrati v semenskih letih s tal, potem ko semena odpadejo. Čas nabiranja semen s tal se razlikuje od države do države ter je odvisen od biologije ciljne drevesne vrste in okoljskih/podnebnih razmer posameznega območja. Na primer v srednji Evropi

je treba semena navadne bukve nabrati od oktobra do novembra, potem ko semena odpadejo. Semena katere od vrst hrastov (*Quercus* spp.) je treba za testiranje semena nabrati jeseni, potem ko semena odpadejo. Vzorec semena mora biti reprezentativen, zato je treba semena nabirati po celotnem območju ploskve. Torej je semena treba zbirati sistematično, in sicer tako, da se pomikamo od enega roba ploskve do drugega in pobereemo nekaj vidnih semen s tal vsakih 10 metrov (korakov) (glejte Sliko 5.5).

Semena divje češnje (*Prunus avium*) je treba nabrati tako, da splezamo na drevesa, preden plodovi dozori in jih pojedjo ptiči. Čas zbiranja plodov se lahko razlikuje od države do države glede na okoljske/podnebne razmere posameznega območja. Plodove divje češnje je v Evropi po navadi treba nabrati od pozne pomladi do sredine poletja.

Po pravilih ISTA (2020) za testiranje semena potrebujemo različne količine semena pri različnih vrstah (Preglednica 5.2). Semena z različnih ploskev je treba hraniti v ločenih bombažnih vrečkah ali perforiranih posodah, ki morajo biti označene. Vsa semena je treba po zbiranju čim prej poslati v laboratorij za testiranje semena.

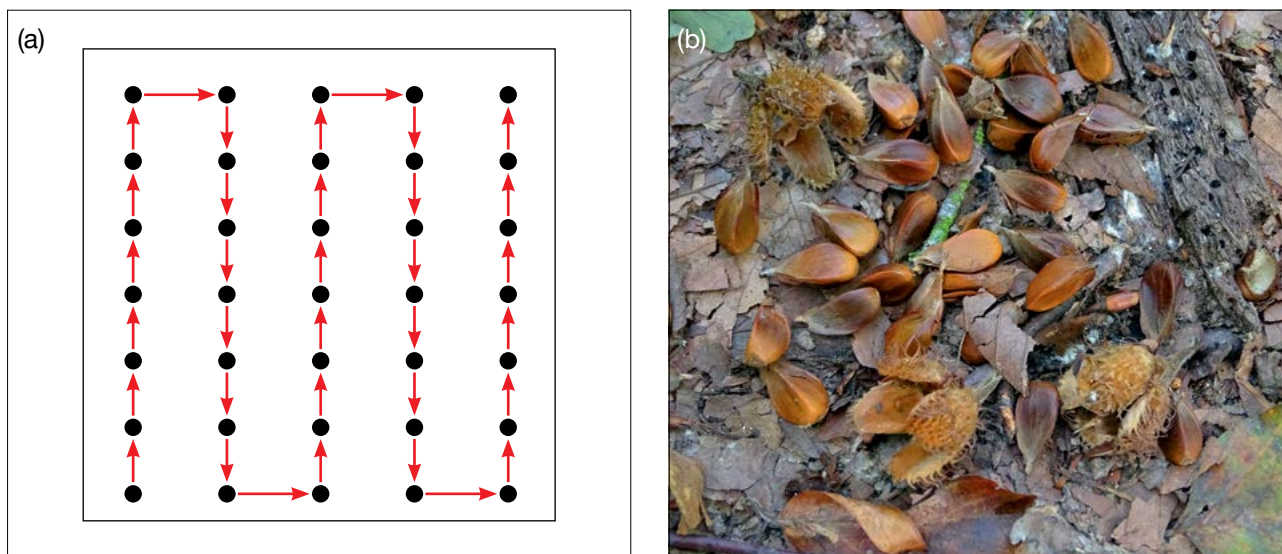
5.4.2.2 Vzorčenje za testiranje semena vrst z lahkim semenom (razširjanje z vetrom) (npr. *Abies* spp., *Populus* spp., *Pinus* spp., *Fraxinus* spp.)

Pri lahkem (razširjanje z vetrom) semenu, kakršnega imajo vrste *Abies* spp., *Populus* spp. in *Pinus* spp., semena za testiranje ni mogoče pobrati s tal po raztrosu semena v semenskem letu. Za to bi porabili preveč časa in truda. Pri iglavcih je treba zrele storže nabrati pred odpiranjem storževih lusk in raztrosom semena; čas raztrosa/nabiranja semen je pri različnih vrstah različen (npr. pri vrstah *Abies* spp. seme dozori in se raztrosi isto leto po cvetenju, v nasprotju z njo pa pri vrstah *Pinus* spp. seme dozori in se raztrosi dve leti po cvetenju). Zato je semena/storže teh vrst treba nabrati s plezanjem na drevesa. Na primer za testiranje semena vrste *Abies* spp. je mogoče in tudi priročno uporabiti mešanico semen s storžev, zbranih za analizo DNK (velja tudi za vrste s težkimi semeni):

- nabrati je treba vsaj 10 storžev z vsakega od 20 izbranih semenskih dreves (potrebno je nabrati približno enako število storžev z vseh dreves tj. 10 storžev na drevo/200 storžev na 20 semenskih dreves) (Slika 5.6);
- storže je treba nabrati tako, da splezamo na drevesa in nabereemo polne storže (z zaprtimi luskami storžev) neposredno z vej;
- storže z različnih materinskih dreves je treba hraniti v ločenih bombažnih vrečkah ali posodah, dokler se luske ne odprejo (odpiranje lusk storžev je mogoče pospešiti z določenimi postopki, npr. najprej jih namočimo in jih nato za nekaj dni vstavimo v komore z nadzorovano temperaturo pod 50 °C);
- nabrane storže je treba 2–3 mesece hraniti v suhem prostoru z dobrim prezračevanjem, dokler se luske storžev ne odprejo in je mogoče pobrati semena;
- zmešati je treba semena vseh 10 storžev z enega drevesa;
- približno 200 semen (~ 20 g semen, odvisno od posamezne vrste) je treba vzorčiti za molekularnogenetske analize (analizira se 20 semen na drevo, vendar za analizo DNK potrebujemo več semen, saj so nekatera lahko prazna), preostala semena se uporabijo za testiranje semena;
- vsa preostala semena z 20 semenskih dreves je treba zmešati in 120 g (~ 3000 semen) mešanice čistih semen vzeti za testiranje semena za *Abies* spp. (Preglednica 5.2 in Preglednica 5.3).

Semena jesenov (*Fraxinus* spp.) je treba nabrati, preden začnejo odpadati (čas nabiranja semen se lahko razlikuje od države do države ter je odvisen od biologije vrste in okoljskih/podnebnih razmer na posameznih območjih). Zato je semena treba nabrati s plezanjem na drevesa.

Življenjska doba semen topolov (*Populus* spp.) je zelo omejena (2–4 dni), zato jih je treba nabrati čim prej po pojavu belih vlaken, podobnih bombažu (po navadi maja, vendar je to v različnih državah različno ter je odvisno od biologije vrste in okoljskih/podnebnih razmer posameznega območja). Zato je semena treba nabrati s plezanjem na drevesa.



Slika 5.5: Sistematično vzorčenje semena s tal (a); semena navadne bukve na tleh (b).



Slika 5.6: Storži bele jelke, zbrani s posameznih dreves.

Preglednica 5.2: Velikost vzorca za testiranje semena. Velikost vzorcev je izpeljana iz nominalne teže 1000 semen za posamezno vrsto, kar bi moralo na podlagi razpoložljivih dokazov zadoščati za večino testiranih vzorcev.

Vrsta	Največja masa serije [g]	Najmanjša masa vzorca	
		Izhodiščni vzorec [g]	Delovni vzorec za analizo čistosti [g]
<i>Abies alba</i> Mill.	1000	240	120
<i>Fagus sylvatica</i> L.	5000	1000	600
<i>Fraxinus</i> spp.	1000	400	200
<i>Pinus nigra</i> J.F. Arnold	1000	100	50
<i>Populus</i> spp.	50	5	2
<i>Prunus avium</i> L.	1000	900	450
<i>Quercus</i> spp.	5000	500 semen	500 semen

Preglednica 5.3: Pregled materiala, potrebnega za molekularnogenetske analize in testiranje semena v okviru gozdnega genetskega monitoringa.

Molekularnogenetske analize (ekstrakcija DNK)		
	Običajne vrste	Vrste s hibridizacijo/kloni
	Enodomne vrste:	Enodomne vrste:
Odrasla drevesa	50 razmnoževalno aktivnih osebkov	50 razmnoževalno aktivnih osebkov (genotipiziranih kot sestavni del procesa izbire dreves; če so odkriti hibridi/kloni, je treba vzorčiti in genotipizirati dodatnih 50; izmed vseh nehibridnih osebkov z unikatnim genotipom se jih 50 naključno izbere za nadaljnje analize)
	Dvodomne ali funkcionalno dvodomne vrste:	Dvodomne ali funkcionalno dvodomne vrste:
	25 ženskih in 25 moških razmnoževalno aktivnih osebkov	25 ženskih in 25 moških razmnoževalno aktivnih osebkov (preverjanje hibridizacije/klonov po enakem postopku kot pri enodomnih vrstah)
Mladje	50 vzorcev mladja na oceno	100 vzorcev mladja na oceno (vseh 100 vzorcev je potrebno genotipizirati, izmed vseh nehibridnih osebkov z unikatnim genotipom se jih 50 naključno izbere za nadaljnje analize; če je potrebno, se nabere in genotipizira dodatnih 50 vzorcev)
Seme	Nabiranje posamično z 20 izbranih semenskih dreves; nabirati je treba vsaj 200–300 semen na drevo z več različnih vej in jih nato zmešati; analizira se 20 semen na drevo, skupaj 400 semen	Nabiranje posamično z 20 izbranih semenskih dreves; nabirati je treba vsaj 200–300 semen na drevo z več različnih vej in jih nato zmešati; analizira se 30 semen na drevo, skupaj 600 semen
Testiranje semena		
Seme	Mešano seme, nabrano s tal ali iz mešanice semen iz storžev/semen, nabranih z 20 posameznih dreves (Preglednica 5.2)	

Viri

- Alizoti PG, Kilimis K, Gallios P (2010) Temporal and spatial variation of flowering among *Pinus nigra* Arn. clones under changing climatic conditions. For Ecol Manag 259:786–797. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2009.06.029>
- Beuker E, Raspe S, Bastrup-Birk A, Preuhsler T (2010) Phenological Observations. Manual Part VI. In: Manual on methods and criteria for harmonized sampling, assessment, monitoring and analysis of the effects of air pollution on forests. UNECE, ICP Forests, Hamburg
- Ducci F, De Cuyper B, Pâques LE, Proietti R, Wolf H (2012) Reference protocols for assessment of trait and reference genotypes to be used as standards in international research projects. CRA SEL, Arezzo, Italy
- Mund M, Kutsch WL, Wirth C, Kahl T, Knohl A, Skomarkova MV, Schulze ED (2010) The influence of climate and fructification on the inter-annual variability of stem growth and net primary productivity in an old-growth, mixed beech forest. Tree Physiol 30:689-704. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpq027>
- Seifert T, Müller-Starck G (2009) Impacts of fructification on biomass production and correlated genetic effects in Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.). Eur J For Res 128:155. <https://doi.org/10.1007/s10342-008-0219-5>
- The International Seed Testing Association (ISTA) (2020) International Rules for Seed Testing. Bassersdorf, Switzerland. <https://doi.org/10.15258/istarules.2020.F>





Priročnik za gozdni genetski monitoring

Chapter 6

Laboratorijske analize in analiza podatkov

Filippos A. ARAVANOPOULOS³, Barbara FUSSI², Marjana WESTERGREN¹, Marko BAJC¹, Darius KAVALIAUSKAS², Nikolaos TOURVAS³, Rok DAMJANIČ¹, Natalija DOVČ¹, Nataša ŠIBANC¹, Paraskevi ALIZOTI³, Ermioni MALLIAROU³, Evangelia AVRAMIDOU^{3,4}, Evangelos BARBAS³, Gregor BOŽIČ¹, Philip BRAILEY-JONES¹, Anna-Maria FARSAKOGLOU^{3,5}, Domen FINŽGAR⁶, Ioannis GANOPOULOS^{3,9}, Monika KONNERT², Hojka KRAIGHER¹

Navedba: Aravanopoulos in sod. (2020) Laboratorijske analize in analiza podatkov. V: Bajc in sod. (ur.) Priročnik za gozdni genetski monitoring. Gozdarski inštitut Slovenije: Založba *Silva Slovenica*, Ljubljana, str. 67–130. <http://dx.doi.org/10.20315/SFS.168>

Povezane ustanove:

- ¹. Aristotelova univerza v Solunu (AUTH), Grčija
- ². Bavarski urad za gozdno genetiko (AWG), Nemčija
- ³. Gozdarski inštitut Slovenije (GIS), Slovenija
- ⁴. Inštitut za sredozemske gozdne ekosisteme, DEMETER, Grčija
- ⁵. Evropski program varovanja gozdnih genskih virov (EUFORGEN), Evropski inštitut za gozdove (EFI), Španija
- ⁶. Inštitut za evolucijsko biologijo, Univerza v Edinburgu, Združeno kraljestvo
- ⁷. Inštitut za žlahtnenje rastlin in rastlinske genske vire, HAO ELGO DEMETER, Grčija

6.1 Uvod

Laboratorijske analize so pomemben del gozdnega genetskega monitoringa. Vsi trije kazalniki (selekcija, genetska variabilnost in pretok genov/sistemi opraveševanja), ki so se preučevali v okviru projekta, temeljijo na podatkih in rezultatih, pridobljenih iz laboratorijskih analiz. Laboratorijske analize lahko razdelimo na tri glavne dele: (1) rokovanje z vzorci in njihovo shranjevanje, (2) testiranje semena in (3) analiza DNK. Prvi del je izrednega pomena, saj je shranjevanje rastlinskega tkiva in DNK bistveno za poznejšo ponovno preučitev starih vzorcev z izboljšanimi protokoli ali novimi vrstami analiz. Ker genetski monitoring temelji na časovnem vrednotenju, je ta možnost seveda izjemno pomembna za ustrezno primerjavo vzorcev. Testiranje semena je bistveno za ugotavljanje fitnesa in se ga izvaja na napredni ravni gozdnega genetskega monitoringa. Analiza DNK oz. molekularnogenetske analize so edina osnova za oceno dveh kazalnikov (»genetska variabilnost« in »pretok genov/sistemi opraveševanja«), z analizo testov osamelcev F_{ST} pa prispeva pa tudi h kazalniku »selekcija«. To poglavje vsebuje tudi informacije o podatkovnih zbirkah ter preverjanju integritete in filtriranju podatkov, zaključki pa se s pomembnimi ugotovitvami o interpretaciji vrednosti genetskega monitoringa, ki so povezane z ukrepi, potrebnimi na ploskvi za genetski monitoring in morda tudi širše.

6.2 rokovanje z vzorci in njihovo shranjevanje

6.2.1 Rokovanje z vzorci

Za rokovanje in obdelavo vseh vrst vzorcev veljajo enaka splošna pravila. Priporoča se upoštevanje laboratorijskega standarda ISO/IEC 17025:2017.

- a. Zagotavlja naj se sledljivost vzorcev in analiz. Poskrbeti je treba za pravilno in konsistentno označevanje vzorcev v vseh fazah analize, od označevanja na terenu naprej. Dobro evidentiranje vzorcev in analiz je ključnega pomena.
- b. Preprečiti je treba navzkrižno kontaminacijo vzorcev. Vse površine in orodja, ki se uporabljajo pri manipulaciji z vzorci, se dekontaminira, da ne pride do prenosa DNK med različnimi vzorci. Na trgu je več izdelkov (tekočin, pen), ki uničujejo DNK na površinah, enak učinek pa ima tudi 5-odstotni natrijev hipoklorit (NaClO). Orodje za manipulacijo z vzorci (pincete, škarje, noži, luknjalniki itd.) je treba med posameznimi manipulacijami dekontaminirati, kar hitro in enostavno storimo z ožiganjem. Delovne konice orodij lahko neposredno ožgemo v plamenu Bunsenovega ali ročnega plinskega gorilnika, ali pa jih potopimo v etanol in ožgemo. Preden orodje uporabite za naslednji vzorec, počakamo 15–20 sekund, da se ohladi.
- c. Viala za shranjevanje vzorcev rastlinskega tkiva in DNK morajo biti sterilne, brez DNK/RNK, nukleaz in pirofosfatov. Za shranjevanje vzorcev pri ultra nizki temperaturi (pod $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) so potrebne primerne krioviale, posode in etikete/označevalna pisala, ki ohranijo integriteto in delovanje pri tako nizki temperaturi. Na trgu so številni primerni izdelki, zato se obrnite na lokalne ponudnike.
- d. Ves potrošni material (na primer pipetne konice za alikvotiranje ekstrahirane DNK) in mediji (na primer pufri za shranjevanje DNK) morajo biti sterilni ter brez DNK/RNK, nukleaz in pirofosfatov.

6.2.2 Shranjevanje vzorcev

Strategija shranjevanja svežega rastlinskega tkiva za analizo DNK je odvisna od vrste tkiva in časa, v katerem je mogoča laboratorijska obdelava vzorcev. V splošnem velja pravilo, da morajo biti vzorci obdelani čim hitreje in shranjeni tako, da se kar najbolj omeji degradacija DNK. Shranjevanje semen za testiranje kalivosti je opisano v podpoglavju 6.2.2.4.

6.2.2.1 Shranjevanje vzorcev rastlinskega tkiva za ekstrakcijo DNK na terenu

6.2.2.1.1 »Mokri« pristop

Stabilnost številnih rastlinskih tkiv lahko na terenu vzdržujemo tako, da jih shranimo v plastično vrečko z zapiranjem na zadrgo, stran od neposredne sončne svetlobe in spremenljive temperature. Škatle iz stiropora, na primer tiste, ki se uporabljajo za pošiljanje temperaturno občutljivih materialov, so priložna rešitev za blaženje prekomernih temperaturnih sprememb in zaščito vzorcev pred neposredno sončno svetlobo. V škatlo damo majhno količino mokrega ledu ali hladilni vložek, vendar poskrbimo, da vzorci ne pridejo neposredno v stik z ledom ali hladilnim vložkom. Tako shranjene vzorce moramo še isti dan spraviti v neprekinjen vir kontroliranega hlajenja (Prendini in sod. 2002).

6.2.2.1.2 »Suhi« pristop

Drug priljubljen pristop za preprečitev prekomerne degradacije DNK v vzorcih rastlinskega tkiva pred dostavo v laboratorij je hitro sušenje vzorcev s silikagelom. Vzorce vstavimo v označene papirnate vrečke in nato v plastične vrečke z zapiranjem na zadrgo skupaj s silikagelom. Uporabimo vsaj 10-kratno količino indikatorskega silikagela v primerjavi z rastlinskim tkivom (razmerje med težo silikagela in vzorca 10 : 1). Vrečke z vzorci in silikagelom shranimo v tesno zaprtih plastičnih škatlah ali plastičnih vrečkah, ki jih je mogoče zatesniti in jih zaščitimo pred neposredno sončno svetlobo. Sušenje vzorcev na terenu je učinkovito samo pri vzorcih z visokim razmerjem med površino in prostornino, na primer pri listih ali iglicah. Večje vejice, plodovi in podobni debelejši vzorci se lahko sušijo predolgo, kar lahko povzroči degradacijo DNK, zato je tovrstne vzorce priporočljivo shraniti pri nižji temperaturi (glej 6.2.2.1.1) in jih še isti dan spraviti v neprekinjen vir kontroliranega hlajenja. (Prendini in sod. 2002, Chase in Hills 1991)

6.2.2.2 Shranjevanje vzorcev rastlinskega tkiva za ekstrakcijo DNK v laboratoriju

6.2.2.2.1 Kratkoročno shranjevanje

Vzorce večine svežih rastlinskih tkiv (vejice z listi/iglicami/brsti, lubje s kambijem) lahko 2–3 dni varno hranimo pri temperaturi od +2 do +4 °C brez pomembnega vpliva na količino ali kakovost DNK (Systema in Schaal 1985, Prendini in sod. 2002). Semena, ki niso rekalcitrantna, v splošnem veliko bolje kljubujejo degradaciji DNK in jih lahko več tednov ali celo mesecev, odvisno od vrste, varno hranimo pri temperaturi od +2 do +4 °C, vendar pa je priporočljivo nadzirati raven vlage, da se prepreči rast plesni in/ali bakterij.

6.2.2.2.2 Srednjeročno shranjevanje

Vzorce svežega rastlinskega tkiva lahko hranimo v zamrzovalniku (–20/–80 °C) več let. Čeprav je biološka (encimska) degradacija DNK v zamrznjenem stanju večinoma zavrtta, še vedno lahko pride do degradacije DNK, zlasti kemične. Če je na voljo dovolj virov, je priporočljivo uporabiti strategije dolgoročnega shranjevanja, kadar koli je mogoče (Prendini in sod. 2002, Campbell in sod. 2018).

6.2.2.2.3 Dolgoročno shranjevanje

Pri dolgoročnem shranjevanju se DNK najbolje ohrani s krioshranjevanjem, tj. ohranjanjem vzorcev v steklastem stanju (pod točko steklastega prehoda za materiale na vodni osnovi). V steklastem stanju sta biološka in kemična degradacija DNK zavrtta, kolikor je le mogoče (Campbell in sod. 2018, Center for Plant Conservation 2020). Pri dolgoročnem krioshranjevanju se vzorci običajno hranijo v sistemih za krioshranjevanje v parni fazi tekočega dušika ali v specializiranih mehanskih zamrzovalnikih z ultra nizko temperaturo, ki omogočajo vzdrževanje temperature pod točko steklastega prehoda za biološke vzorce (navaja se temperatura med –132 in –136 °C) (Prendini in sod. 2002, Campbell in sod. 2018, Center for Plant Conservation 2020). Ker je za sisteme za krioshranjevanje

potrebna posebna infrastruktura in/ali so povezani z visokimi začetnimi investicijami in tekočimi stroški, za številne raziskovalne ustanove običajno niso dosegljivi (Campbell in sod. 2018, Center for Plant Conservation 2020).

Številna rastlinska tkiva ostanejo dovolj ohranjena za ekstrakcijo visokokakovostne DNK tudi pri dolgoročnem shranjevanju pri manj strogih pogojih (od -80 do -20 °C). Neubig in sod. (2014) so ugotovili, da se je v rastlinskem materialu, ki je bil zamrznjen 24 let, ohranila DNK visoke kakovosti, ne glede na to, ali je bilo tkivo shranjeno pri temperaturi -20 ali -80 °C. Zlasti v semenu se DNK visoke kakovosti ohrani tudi brez krioshranjevanja, ekstrahirati pa jo je mogoče celo iz starega neviabilnega semena, če je shranjeno v stabilnih pogojih pri ali pod -20 °C (Walters in sod. 2006). Čeprav je krioshranjevanje nedvomno najzanesljivejši in najvarnejši pristop za dolgoročno shranjevanje rastlinskega tkiva z nizkim tveganjem degradacije DNK, je mogoče DNK v rastlinskih tkivih dobro ohraniti tudi pri višjih temperaturah pod lediščem (Walters in sod. 2006, Neubig in sod. 2014). Da se tveganje degradacije DNK kar najbolj zmanjša, je treba slediti naslednjim priporočilom za dolgoročno shranjevanje vzorcev rastlinskega tkiva:

- a. Zagotoviti moramo stabilne pogoje shranjevanja in preprečiti temperaturna nihanja. V splošnem velja, da mora biti temperatura shranjevanja čim nižja. Dolgoročno shranjevanje pod točko steklastega prehoda, tj. krioshranjevanje, je najbolj priporočljivo, sledita mu shranjevanje pri -80 °C in nato pri -20 °C. Shranjevanju pri temperaturi nad -20 °C se izogibamo.
- b. Izmenjujoča zamrzovanja in odmrzovanja poškodujejo tkivo in DNK (glej okvir 6.1 in 6.2), zato je priporočljivo, da se vzorci rastlinskega tkiva hranijo v več ponovitvah, tako da lahko za ekstrakcijo DNK iz prostora za shranjevanje vzamemo in odmrzujemo samo eno ponovitev namesto celotne partije. Če je mogoče, ponovitve razdelite med vsaj dva sistema za shranjevanje, da se zmanjša tveganje izgube vseh ponovitev, če pride do kritične okvare opreme.
- c. Ker je večina procesov degradacije DNK odvisna od prisotnosti vode, omogoča sušenje vzorcev (z liofilizacijo ali silikagelom) pred zamrznitvijo dodatno raven zaščite pred degradacijo DNK, zlasti če pride do odmrznitve zaradi okvare opreme. Zlasti seme, ki ni rekalcitirano, mora biti suho. Priporočljivo je, da seme največ en teden sušimo na zraku, preden ga zamrznemo (Walters in sod. 2006).
- d. Če je na voljo dovolj virov, je priporočljivo poleg vzorcev rastlinskega tkiva shranjevati tudi ekstrakte DNK, saj so vzorci ekstrahirane DNK stabilnejši od tkiva (Prendini in sod. 2002). Več informacij o shranjevanju vzorcev DNK je v poglavju 6.2.2.3.

Okvir 6.1: Cikli zamrzovanja in odmrzovanja, I. del

Pri vseh pristopih, ki vključujejo zamrzovanje vzorcev rastlinskega tkiva, se moramo izogibati večkratnim ciklom zamrzovanja in odmrzovanja! Poleg tega, da lahko cikli zamrzovanja in odmrzovanja neposredno prispevajo k degradaciji DNK (Glej okvir 6.2: Cikli zamrzovanja in odmrzovanja, II. del, v razdelku 6.2.4.1), povzročajo tudi raztrganje membran celic in organelov, s čimer DNK izpostavlja encimom, ki jo degradirajo, in povečujejo tveganje encimske razgradnje DNK ob odmrzovanju vzorcev. (Campbell in sod. 2018)

6.2.2.3 Shranjevanje ekstrahirane DNK

Ustrezni pogoji shranjevanja zagotavljajo ohranjanje količine in integritete ekstrahirane DNK na ravneh, primernih za nadaljnjo analizo. Čeprav DNK velja za razmeroma stabilno biološko makromolekulo, lahko njen razpad povzročijo različni dejavniki. Ob domnevi, da je bila v postopku izolacije DNK iz rastlinskih tkiv odstranjena vsa nukleazna aktivnost, glavno grožnjo za ohranitev DNK predstavlja kemična degradacija (Adams in sod. 1999, Briggs 1999, Bada in sod. 1999, Soltis in Soltis 1993, Thomas in Paabo 1994, Yagi in sod. 1996). Poleg tega je DNK občutljiva na visoko temperaturo in ionizirajoče sevanje, vključno z deli ultravijoličnega spektra, zato je treba ukreniti vse potrebno, da se prepreči izpostavljanje DNK takim pogojem. (Prendini in sod. 2002, Campbell in sod. 2018)

V vodnih raztopinah, ki so preferenčni medij za shranjevanje DNK, so glavni vzroki za degradacijo DNK hidrolitična cepitev, deaminacija, depurinacija, depirimidinacija in oksidativne poškodbe (Briggs 1999, Bada in sod. 1999, Thomas in Paabo 1994). Hidrolizo, deaminacijo, depurinacijo in depirimidinacijo lahko zavremo, če DNK hranimo v alkalnih pufrskih raztopinah (pH 8,0–9,0), saj so ti procesi degradacije katalizirani v kislih pogojih. Oksidativne poškodbe se ob prisotnosti kovinskih kationov (Fe^{3+} , Cu^{2+} itd.) povečajo zaradi Fentonove reakcije, pri čemer so škodljive že koncentracije nad 5 ppb. Zato se priporoča dodajanje kelatnih reagentov, na primer EDTA, v raztopino za shranjevanje DNK (Prendini in sod. 2002).

6.2.2.3.1 Strategije shranjevanja DNK

Ne glede na strategijo shranjevanja je vselej priporočljivo, da se iz istega vzorca DNK naredi več alikvotov, od katerih se lahko enega takoj uporabi za nadaljnje postopke, preostale pa se dolgoročno shrani. Koliko časa se DNK lahko ohrani, je odvisno od pogojev shranjevanja, pa tudi od količine, integritete in čistosti ekstrahirane DNK.

Pri shranjevanju vzorcev ekstrahirane DNK veljajo podobna pravila kot za vzorce svežega rastlinskega tkiva – najvarnejša strategija je shranjevanje DNK v steklastem stanju, tj. pod temperaturo steklastega prehoda za vodne raztopine bioloških polimerov, kar je še zlasti pomembno pri zelo dolgoročnem shranjevanju (Campbell in sod. 2018).

Kljub napredku pri shranjevanju posušenih vzorcev DNK pri sobni temperaturi s tržno dostopnimi sistemi ali interno razvitimi protokoli je še prezgodaj, da bi zagovarjali prehod na shranjevanje suhe DNK pri sobni temperaturi, zlasti ko gre za vzorce z višjo vsebnostjo inhibitorjev (na primer rastlinska tkiva) in daljša časovna obdobja (Ivanova in Kuzmina 2013).

Preglednica 6.1: Pogoste strategije shranjevanja vzorcev DNK. ST – sobna temperatura

Strategija shranjevanja	Pogoji	Medij	Obdobje ¹
Kratkoročno	od +2 °C do +8 °C	10 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, pH 8,5–9,0	od nekaj tednov do nekaj mesecev
Srednjeročno	–20/–80 °C	10 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, pH 8,5–9,0	več let
Dolgoročno	–80 °C, oborina	Etanol	od nekaj let do nekaj desetletij
Zelo dolgoročno	–196 °C (tekoči dušik)	10 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, pH 8,5–9,0	desetletja
Zelo dolgoročno	Od –136 do –150 °C (zamrzovalnik z ultra nizko temperaturo)	10 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, pH 8,5–9,0	desetletja
Zelo dolgoročno	ST, posušeno (brez vode)	Različno ²	desetletja ³

¹ Navedena obdobja je treba obravnavati kot oceno na podlagi vrednosti, o katerih poroča literatura, in izkušenj laboratorijev, vključenih v projekt LIFEENMON.

² Večina pristopov za shranjevanje vzorcev DNK v posušeni obliki vključuje uporabo zaščitnega matriksa, na primer trehaloze ali polivinil alkohola (PVA). Zaščita posušenih vzorcev DNK pred rehidracijo in temperaturnimi nihanjem je predpogoj za preprečitev degradacije DNK.

³ Odstranitev vode v teoriji zagotavlja podobno raven zaščite pred degradacijo DNK kot krioshranjevanje, vendar je to močno odvisno od popolne preprečitve rehidracije posušenih vzorcev DNK, ki jo dolgoročno pogosto težko zagotovimo.

Potekajoči interni preizkusi uveljavljenega proizvajalca kompletov za izolacijo DNK/RNK Qiagen GmbH nakazujejo, da je DNK z visoko molekulsko maso v raztopini na osnovi Tris-EDTA s pH 8,5 mogoče varno hraniti vsaj 16 let pri –20 °C in vsaj 8 let pri +2 do +8 °C, ob pogoju, da je DNK zelo čista (odsotnost nukleazne aktivnosti) (Hartmann in sod. 2016). Opozoriti je treba, da je bila DNK, ki so jo v preizkusih uporabili pri Qiagen, izolirana iz vzorcev krvi in da je rastlinski material v splošnem veliko bolj problematičen z vidika odstranitve nečistoč med postopkom ekstrakcije DNK, zato je pri odločanju o najprimernejši strategiji shranjevanja vzorcev rastlinske DNK nujna previdnost.

Okvir 6.2: Cikli zamrzovanja in odmrzovanja, II. del

Čeprav naj bi bili učinki večkratnih ciklov zamrzovanja in odmrzovanja na kakovost DNK v laboratorijih za molekularno genetiko splošno znani, je njihov dejanski vpliv še vedno predmet polemičnih razprav. Študija Schuster in Appleby (1983) ni našla dokazov, da bi večkratni cikli zamrzovanja in odmrzovanja povzročali degradacijo DNK. Prav tako je študija izpostavila pomisleke glede uporabe radioaktivno označene DNK v preteklih študijah, saj bi bili lahko vzrok za degradacijo DNK sami radioaktivni označevalci in ne število ciklov zamrzovanja in odmrzovanja. Skladno z načelom »previdnost je mati modrosti« je vzorce DNK še vedno priporočljivo shranjevati v alikvotih, da se kar najbolj omeji degradacija, ne le zaradi večkratnih ciklov zamrzovanja in odmrzovanja, temveč tudi zaradi kemične degradacije, in da se zmanjša možnost kontaminacije celotnega vzorca DNK. (Prendini in sod. 2002, Campbell in sod. 2018)

6.2.2.4 Shranjevanje semena za testiranje

Seme za testiranje v okviru gozdnega genetskega monitoringa je treba nabrati, ko je zrelo, med naravnim raztrosom ali tik pred njim (Hay in Smith 2003). Če seme naberemo prezgodaj (nerazvito seme), lahko izgubi viabilnost in med testiranjem ne kali (Pedrini in sod. 2020, De Vitis in sod. 2020). Izjema je nabiranje »zelenega semena« *Fraxinus* spp. pred nastopom dormance, ki je tako uporabno za takojšnje testiranje kalivosti. Vzorec za testiranje semena na ploskvi za genetski monitoring pridobimo tako, da naključno naberemo majhne količine semena na različnih mestih po vsej ploskvi, ki dajejo reprezentativen vzorec, ali na različnih delih krošnje (če seme/storže nabiramo neposredno s plezanjem na drevesa), nato pa vse seme zmešamo skupaj, da dobimo skupni vzorec. Druga možnost je, da skupaj zmešamo del semen, zbranih z 20 dreves za molekularnogenetske analize, in jih uporabimo za testiranje semena. Vsaka faza testiranja semena mora biti izvedena z ustreznimi metodami in opremo skladno s pravili ISTA (2020, na voljo na naslovu https://www.seedtest.org/en/ista-rules-2019-_content---1--3410.html). Ker so rezultati testiranja semena za gozdni genetski monitoring ključni, npr. za oceno dejanske stopnje opraševanja med sorodniki, testiranje semena opravimo še v istem letu/sezoni po nabiranju. Daljše shranjevanje semena lahko drastično zmanjša kalivost in vpliva na rezultate testa kalivosti (TK) in topografskega testa s tetrazolom (TT) (biokemični test viabilnosti), zlasti pri rekalcitrantnih vrstah. Zato testiranje semena opravimo takoj, ko seme prispe v laboratorij za testiranje.

6.3 Testiranje semena

Testiranje semena (absolutne mase, kalivosti in viabilnosti – TTC) je treba opraviti skladno s protokoli mednarodnih pravil za testiranje semena (ISTA, 2020, na voljo na naslovu https://www.seedtest.org/en/ista-rules-2019-_content---1--3410.html). Velikost vseh vzorcev je izpeljana iz mase 1000 semen za posamezno vrsto, kar bi moralo na podlagi razpoložljivih dokazov zadoščati za večino testiranih vzorcev, razen za vrste *Quercus* spp. in *Prunus* spp., pri katerih mora biti velikost vzorca 500 semen.

Metode testiranja semena sedmih ciljnih drevesnih vrst projekta LIFEGENMON so predstavljene v Preglednici 6.2. Za belo jelko (*Abies alba* Mill.) je bil na primer v okviru projekta LIFEGENMON opravljen samo test TK, za navadno bukev (*Fagus sylvatica* L.) pa samo test TT. Za obe vrsti je mogoče opraviti obe vrsti testov (TT in TK), vendar pa je test TT bolj priporočljiv, saj je občutno hitrejši.

Preglednica 6.2: Vrste testov, ki jih za vrste, obravnavane v projektu LIFE GENMON, priporoča ISTA (2020).

Vrsta	Vrsta testa, ki ga priporoča ISTA: TK – test kalivosti TT – topografski test s tetrazolom	Opombe
<i>Abies alba</i> Mill.	TK	Predhodna ohladitev 21 do 28 dni za kalitev
<i>Fagus sylvatica</i> L.	TT	Če se uporablja TK: 24 tednov za kalitev/prekinitev dormance
<i>Fraxinus</i> spp.	TT	Če se uporablja TK: 9 mesecev stratifikacije in do 56 dni za kalitev (opomba: zeleno seme kali takoj)
<i>Pinus nigra</i> J. F. Arnold	TK	Do 21 dni za kalitev
<i>Populus</i> spp.	TK	Do 10 dni za kalitev
<i>Prunus avium</i> (L.) L.	TT	Če se uporablja TK: predhodna ohladitev za 3–4 mesece, do 28 dni za kalitev
<i>Quercus</i> spp.	TK	Do 28 dni za kalitev (priporočljiva je predpriprava; uporabite specifične protokole)

6.3.1 Ekstrakcija semena bele jelke za testiranje semena

Po zbiranju storžev:

- Storži posameznih dreves morajo biti shranjeni ločeno v označenih plastičnih zabojnikih.
- Dno zabojnika mora biti pokrito z mrežo, da seme ne pade skozi luknje (glej Sliko 6.1a).



Slika 6.1: Zabojniki za shranjevanje storžev bele jelke, preden luske odpadejo in se seme sprosti (a in b); sito za ločevanje semena od drugih delov storžev, potem ko razpadejo (c).

- Vsi zabojniki s storži morajo biti shranjeni na zračnem mestu nekaj mesecev, dokler luske ne začnejo odpadati s storžev (Slika 6.1b).
- Ko s storžev odpadejo luske, je treba očistiti seme vsakega drevesa posebej (Slika 6.1c, sito za ločevanje semena *Abies* spp. od delov storžev, krilc itd.).

6.3.2 Priprava semena bukve in bele jelke/Borisove jelke (*Abies borisii-regis*) za testiranje

- Po čiščenju za jelko uporabimo 120 g, za bukev pa 600 g mešanice, pripravljene iz enakih količin semen z vseh dreves, za nadaljnjo analizo; med čiščenjem ne smemo odstraniti praznih semen, saj mora biti delovni vzorec za analize v celoti reprezentativen.
- Vse analize morajo biti opravljene skladno s protokoli ISTA (2020). Velikost vzorcev je izpeljana iz absolutne mase semen za posamezno vrsto, kar bi moralo na podlagi razpoložljivih dokazov zadoščati za večino testiranih vzorcev.

Opomba: Za godzni genetski monitoring se uporablja samo čisto seme, zato določanje čistosti ni potrebno, saj se vse seme nabira samo z namenom določitve absolutne mase semen in testiranja kalivosti/viabilnosti, razen če je potrebno prepoznati tudi kakršne koli škodljivce in bolezni.

Preglednica 6.3: Velikost dostavljenih in delovnih vzorcev semena izbranih drevesnih vrst, spremenjena po ISTA (2020).

Vrsta	Dostavljeni vzorec	Delovni vzorec
<i>Abies alba</i>	240 g	120 g
<i>Fagus sylvatica</i>	1000 g	600 g
<i>Fraxinus</i> spp.	400 g	200 g
<i>Pinus nigra</i>	100 g	50 g
<i>Populus</i> spp.	5 g	2 g
<i>Prunus avium</i>	500 semen	500 semen
<i>Quercus</i> spp.	500 semen	500 semen

6.3.3 Določitev absolutne mase semena

Določitev absolutne mase mora slediti protokolom ISTA (2020).

Delovni vzorec mora biti celotna frakcija čistega semena. Spremembo vsebnosti vlage v delovnem vzorcu je treba preprečiti, kolikor je le mogoče, zato se delovne vzorce pred testiranjem hrani le kratek čas, v posodah, odpornih proti vlagi.

Štetje ponovitev: Ročno ali z napravo za štetje iz delovnega vzorca naključno naštejete 8 ponovitev po 100 semen. Vsako ponovitev stehtamo v gramih na tri decimalna mesta natančno.

Izračun in prikaz rezultatov

- Če štetje opravimo strojno, absolutno maso semen izračunamo iz mase celotnega delovnega vzorca.
- Če štetje opravimo s ponovitvami, iz mas osmih ali več ponovitev po 100 semen izračunajte povprečno absolutno maso semen.
- Rezultat se izračuna na tri decimalna mesta natančno, s formulo:

$$\text{Absolutna masa (g)} = \frac{(\text{vsota 8 ponovitev (g)} \times 10)}{8}$$

6.3.4 Test kalivosti

Testi kalivosti morajo slediti protokolom ISTA (2020) s poenostavitvijo, ki je predstavljena v nadaljevanju.

Kalivost

Kalivost pomeni delež semen, ki so v razmerah in obdobju, določenih v Preglednici 6.4, tvorila klice, ki jih razvrščamo med normalne.

Osnovne strukture klice

Te strukture so bistvene za nadaljnji razvoj klice v uspešno rastlino: korenina – radikula; os poganjka; klični listi; terminalni brsti.

Normalno razvite klice

Normalno razvite klice imajo potencial, da se v kakovostnih tleh ter ob ugodnih vlažnostnih, temperaturnih in svetlobnih razmerah razvijejo v uspešne rastline. Da klico štejemo za normalno razvito, se mora uvrstiti v eno izmed naslednjih kategorij:

1. Nedotaknjene klice: klice, ki imajo vse osnovne strukture dobro razvite, proporcionalno celovite in zdrave.
2. Klice z blagimi defekti: klice, ki imajo nekatere blage defekte osnovnih struktur, če je njihov razvoj sicer zadovoljiv in uravnotežen ter primerljiv z nedotaknjenimi klicami iz istega testa.
3. Klice s sekundarno okužbo: klice, ki bi spadale v 1. ali 2. kategorijo, vendar so jih prizadele plesni ali bakterije iz drugih virov, ne iz izvornega semena.

Nenormalno razvite klice

Nenormalno razvite klice nimajo potenciala, da bi se v kakovostnih tleh ter ob ugodnih vlažnostnih, temperaturnih in svetlobnih razmerah razvile v uspešne rastline.

Med nenormalno razvite klice uvrščamo:

1. Poškodovane klice: klice, ki jim manjka katera od osnovnih struktur ali so tako hudo in nepopravljivo poškodovane, da uravnotežen razvoj ni pričakovan.
2. Deformirane in neuravnotežene klice: slabo razvite klice, klice s fiziološkimi motnjami ali deformiranimi ali neproporcionalnimi osnovnimi strukturami.
3. Razkrojene klice: klice, ki imajo katero od osnovnih struktur zaradi primarne okužbe tako obolelo ali razkrojeno, da normalen razvoj ni mogoč.

Večklične semenske enote

Semenske enote, ki lahko tvorijo več kot eno klico.

Seme, ki ni vzknilo

Seme, ki do konca obdobja testiranja v pogojih, navedenih v Preglednici 6.4, ni vzknilo, se razvrsti, kot sledi:

1. Trdo seme: seme, ki je ob koncu obdobja testiranja ostalo trdo, ker ni vpilo vode.
2. Sveže seme: seme, razen trdega semena, ki v pogojih testa kalivosti ni vzknilo, a je ostalo čisto in čvrsto ter ima potencial, da se razvije v normalno razvito klico.
3. Mrtvo seme: seme, ki ob koncu obdobja testiranja ni niti trdo niti sveže niti ni tvorilo nobenega dela klice.
4. Druge kategorije: v nekaterih okoliščinah lahko prazno seme in seme, ki ni vzknilo, nadalje razvrstimo v razrede, ki so opisani v pravilih ISTA, 5.2.7.A.

Seme, ki ne vzkali je potrebno pregledati in ugotoviti odstotek praznih semen, saj se ta podatek uporabi za izračun verifikatorja odstotek polnih semen za kazalnik "selekcija" na napredni ravni. Posledično je nujno, da se prazna semena med postopkom čiščenja pred testom kalivosti (ali biokemičnim testom testom viabilnosti) ne odstrani, razen če se izvede ločeno ugotavljanje odstotka praznih semen, kar pa v splošnem ni priporočljivo, saj

poveča število delovnih ur in tudi količino semena, potrebnega za izvedbo vseh preizkusov. Odstotek praznih semen se izračuna na enak način kot kalivost (glej "Izračun in prikaz rezultatov" in razdelek 6.5.5.1.2).

Material

Kot je prikazano v Preglednici 6.4, se kot substrata pogosto uporabljata papir in pesek. Zemlja in umetni kompost nista priporočljiva primarna substrata za testiranje. Dovoljena sta le v posebnih primerih.

Delovni vzorec

Iz čistega semena vzamemo štiristo (400) semen v ponovitvah po sto **(100) ter jih enakomerno in na zadostni oddaljenosti razmestimo po vlažnem substratu.** Ponovitve lahko razdelimo v podponovitve po 50 ali 25 semen, odvisno od velikosti semen in potrebnega razmika.

Večkličnih semenskih enot za test kalivosti ne ločujemo, temveč jih pri testiranju obravnavamo kot eno seme.

Trajanje testa

Trajanje testa za posamezne vrste je navedeno v Preglednici 6.4. Trajanje postopkov za prekinitev dormance pred ali med testom ISTA ni vključeno v obdobje testiranja.

Vrednotenje

Za vrednotenje morajo biti osnovne strukture dovolj razvite, da omogočajo prepoznavo nepravilnosti.

Če vzorci, testirani na papirju, tvorijo klice, ki jih ni mogoče takoj ovrednotiti, moramo test ponoviti v pesku ali zemlji dobre kakovosti pri temperaturi, navedeni v Preglednici 6.4, ter v ugodnih vlažnostnih in svetlobnih razmerah.

Ob koncu testa kalivosti moramo med semeni, ki niso vzkli, določiti tista, ki se uvrščajo med sveže seme. Prazno seme in seme, ki so ga poškodovale žuželke, lahko ovrednotimo pred testom kalivosti.

Preglednica 6.4: Metode za izvedbo testa kalivosti. (Pri nekaterih vrstah, navedenih v 6. stolpcu, je potrebna podvojitve testa (s predhodno ohladitvijo ali brez).

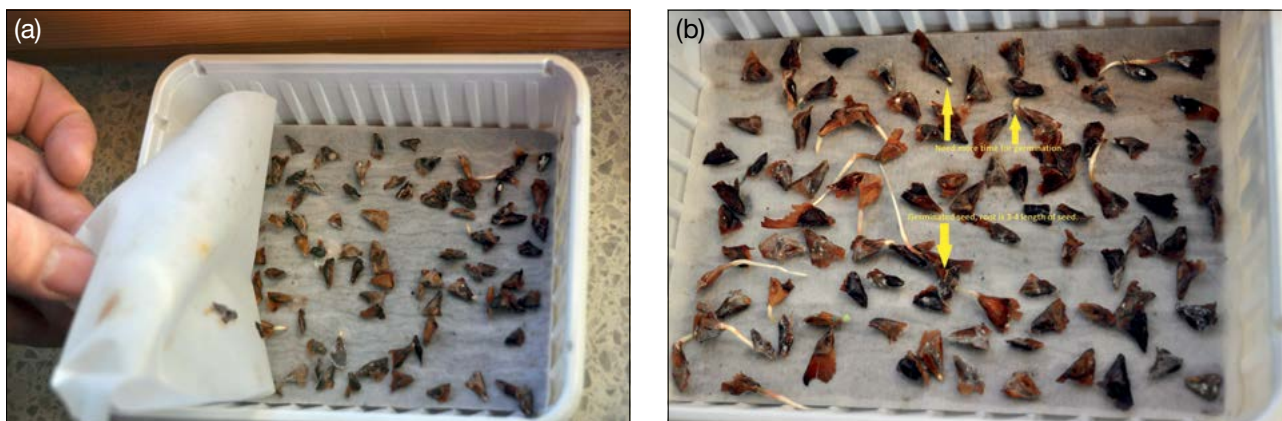
Vrsta	Predmet navodil				Dodatna navodila, vključno s priporočili za prekinitev dormance
	Substrat	Temperatura (°C)	Prvo štetje (dnevi)	Zadnje štetje (dnevi)	
<i>Abies alba</i>	NP/MP	20 °C/16 h + 30 °C/8 h	7	28	Predhodna ohladitev 21 dni pri 3–5 °C
<i>Fagus sylvatica</i>	NP	3 °C/16 h + 5 °C/8 h	–	–	1. Trajanje testa je odvisno od dormance in je lahko v skrajnem primeru približno 24 tednov. 2. Izvedba TT (tetrazol test).
<i>Pinus nigra</i>	NP	20 °C/16 h + 30 °C/8 h	7	21; (14)	
<i>Fraxinus spp.</i>	NP	20 °C/16 h + 30 °C/8 h	14	56	1. 2 meseca predhodna inkubacija semena pri 20 °C in nato 7 mesecev pri 3–5 °C. 2. Izvedba TT (tetrazol test).
<i>Prunus avium</i>	S	20 °C/16 h + 30 °C/8 h	7	28	1. Predhodna ohladitev 3–4 mesece pri 3–5 °C. 2. Izvedba TT (tetrazol test).
<i>Populus spp.</i>	NP	20 °C/16 h + 30 °C/8 h	3	10	
<i>Quercus spp.</i>	TS; (S)	20 °C/24 h	7	28	Seme se namoči za do 48 ur, prereže na delu, kjer je brazgotina, in odstrani perikarp.

Pomen kratic:

NP – na papirju;
MP – med papirjem;

S – pesek;
TS – na pesku;

TT – topografski tetrazol test;



Slika 6.2: (a) Zaboji s semenom (MP – seme med papirjem); (b) Primer kalitve semen *Abies* spp. (Foto: Darius Kavaliauskas)

Večklične semenske enote štejemo kot posamezne enote. Rezultat testa izraža odstotek enot, ki so tvorile vsaj eno normalno klico. Lahko določimo tudi število normalnih klic, ki jih tvori 100 semenskih enot, ali število semenskih enot, ki so tvorile eno, dve ali več kot dve normalni klici.

Izračun in prikaz rezultatov

Rezultati so prikazani kot odstotek. Ko so štiri ponovitve s po 100 semeni znotraj največjega dovoljenega razpona, povprečje predstavlja odstotek kalitve, ki se navede na prilagojenem certifikatu na podlagi mednarodnega certifikata o analizi semena ISTA. Povprečni odstotek se zaokroži na najbližje celo število.

V Preglednici 6.4, »Kalitvene metode«, so navedeni dovoljeni substrati, trajanje testa ter priporočeni dodatni postopki za dormantne vzorce:

- Substrati – zaporedje primernih substratov je povsod enako in ne izraža prednosti: NP (na papirju); MP (med papirjem); S (pesek). MP in NP se lahko nadomestita s FP (filtrirni papir).
- Temperatura – zaporedje primernih temperatur je povsod enako in ne izraža prednosti: izmenične temperature, najprej najvišja; konstantne temperature, najprej najvišja.
- Prvo štetje – čas prvega štetja je približen in se nanaša na najvišjo izmed primernih temperatur na papirnatih substratih. Če je izbrana nižja alternativna temperatura ali če test poteka v pesku, je treba štetje morda zamakniti. Pri testiranju v pesku z zadnjim štetjem po 7–10 (14) dneh lahko prvo štetje izpustimo.
- Svetloba – za boljši razvoj klic se pri testu v splošnem priporoča osvetlitev. Če je v določenih primerih za spodbuditev kalitve dormantnih vzorcev potrebna svetloba ali če bi svetloba lahko zavrla kalitev in morajo biti substrati v temi, je to navedeno v zadnjem stolpcu.

Posebnost za jelko: Za test kalivosti bele jelke uporabimo štiri ponovitve po 100 semen (skupaj 400 semen). Predhodna ohladitev semen v hladilniku traja 21 dni pri temperaturi 3–5 °C. Skladno z ISTA (2020) je substrat NP – na papirju, vendar je lahko substrat za test kalivosti tudi MP – med papirjem (izbirno) (Slika 6.2a). Spodaj lahko uporabimo nekaj dodatnega celuloznega papirja, ki zadrži vodo/vlago za seme. Vse ponovitve morajo v sobah za kalitev ostati 28 dni (trajanje lahko podaljšamo še za dva tedna). Uporabljata se dva temperaturna režima: 16 ur pri 20 °C in 8 ur pri 30 °C (ponovi se vsak dan skozi ves test kalivosti). Prvo štetje vzkaljenega semena je 7. dan (v vsaki ponovitvi preštete semena s korenino, ki je 3–4-krat daljša od semena (Slika 6.2b). Vzkaljeno seme se prešteje vsakih 7 dni do konca testa kalivosti.

Rezultati so izraženi v odstotkih (povprečje 4 ponovitev): odstotek normalnih klic, nenormalnih klic, trdega semena, svežega semena in mrtvega semena. Preostanek semen, ki med testom niso vzkli, moramo odpreti (prerezati s skalpelom) in oceniti, zakaj niso vzkli (mogoči vzroki so: prazno seme; sveže seme; trdo seme; mrtvo seme).

6.3.5 Biokemični test viabilnosti, topografski test s tetrazolom

Priprava in obdelava semena

Seme mora biti pripravljeno tako, da se olajša prepojitev z raztopino tetrazola. Pripravljeno seme ali zarodke nato popolnoma potopimo v raztopino tetrazola. Temperatura in trajanje sta opisana v pravilih ISTA. Ob poteku navedenega časa odlijemo raztopino, seme speremo z vodo in ga pregledamo.

Vsako seme ocenimo kot viabilno ali neviabilno na osnovi vzorcev obarvanosti in ohranjenosti tkiva.

Specifična navodila za pripravo, obdelavo in vrednotenje posameznih odobrenih vrst so v protokolih ISTA (2020) in v Preglednici 6.5.

Posebnost za bukev: Za test s tetrazolom pri navadni bukvi uporabimo štiri ponovitve po 100 semen (skupaj 400 semen). Z vseh semen moramo odstraniti perikarp in nato seme za 18 ur namočiti v vodi pri 20 °C. Nato odstranimo semensko ovojnico in seme namočimo v 1-odstotno raztopino tetrazola za ≈ 10–18 ur pri 30 °C. Po obarvanju odpremo ključne liste in ovrednotimo seme. Največja dovoljena površina neobarvanega, ohlapnega ali nekrotičnega tkiva je: vrh radikule, 1/3 distalne ploskve ključnih listov, če je stanje površinsko.

Rezultati se izrazijo v odstotku viabilnega semena, neviabilnega semena (npr. zaradi poškodb žuželk ali neobarvanosti pri testu s tetrazolom) in praznega semena.

V Preglednici 6.5 so predpisani postopki za predhodno navlažitev (vrsta in čas), pripravo predhodno navlaženega semena pred obarvanjem, obarvanje (koncentracija raztopine in čas) in pripravo na vrednotenje glede na vzorce obarvanosti. Trajanje postopka obarvanja, navedeno v 4. stolpcu, temelji na temperaturi **30 °C**. Običajno so vitalna vsa semena s popolnoma obarvanim zarodkom in tista z neobarvanimi ali nekrotičnimi deli, kot je navedeno v 6. stolpcu. Pri nekaterih vrstah mora biti popolnoma obarvan tudi endosperm (pravi endosperm, perisperm, tkivo gametofita). Pri vrednotenju moramo upoštevati celotno strukturo; če smo pri pripravi pred obarvanjem katerega od delov odstranili, se šteje kot popolnoma obarvan ali kot del največje dovoljene neobarvane površine.

Preglednica 6.5: Postopki za test s tetrazolom.

Vrsta	Predhodno vlaženje pri 20 °C		Obarvanje			Vrednotenje		Opombe
	Tip	Najkrajši čas (h)	Priprava pred obarvanjem	Koncentracija (%)	Optimalni čas pri 30 °C (h)	Priprava na vrednotenje in tkivo, ki ga opazujemo	Največja dovoljena površina neobarvanega, ohlapnega ali nekrotičnega tkiva	
Abies spp.	V	18	1. Prečno prerežemo na obeh koncih, da odpremo votlino z zarodkom.	1	18–24	1. Naredimo vzdolžen rez skozi endosperm in izpostavimo zarodek; odstranimo semensko ovojnico.	Majhna površinska nekroza na distalni strani endosperma.	Staro in suho seme lahko daje bolj konsistentne rezultate, če se ga za 48 ur namoči. Pri vrednotenju lahko pomaga dodajanje fungicida.
			2. Naredimo vzdolžen rez ob zarodku.	1	12–18	2. Izpostavimo zarodek; odstranimo semensko ovojnico.	Nič. Vključno z endospermom.	
	Pripravimo suho seme		1. Prečno prerežemo na obeh koncih, da odpremo votlino z zarodkom. * Seme, prepojeno s TZ, 3-krat obdelamo z nizkim tlakom.	1	18	1. Naredimo vzdolžen rez skozi endosperm in izpostavimo zarodek; odstranimo semensko ovojnico.	Nič, razen majhne površinske nekroze na zunanjem delu endosperma, ki ni povezan z votlino zarodka.	Staro in suho seme lahko daje bolj konsistentne rezultate, če ga za 48 ur namočimo. * Izbirno.
			2. Naredimo vzdolžen rez ob zarodku.	1	12	2. Izpostavimo zarodek; odstranimo semensko ovojnico.		
Fagus spp.			Odstranimo perikarp.*					* Perikarp zelo suhega semena lažje odstranimo po nekajurnem namakanju.
	V	18	1. Odstranimo semensko ovojnico.	1; 0,5	10–12; 15–18	1. Razpremo klične liste.	Vrh radikule, 1/3 distalne ploskve kličnih listov, če je stanje površinsko.	
			2. Naredimo vzdolžen rez skozi klične liste, pri čemer se izognemo osi zarodka.	1	16–24	2. Odstranimo semensko ovojnico in izpostavimo notranjo stran kličnih listov.		
		Odstranimo perikarp suhega semena.*	Odstranimo semensko ovojnico.	1	18	–	Vrh radikule, 1/3 distalne ploskve kličnih listov, če je stanje površinsko.	* Perikarp zelo suhega semena lažje odstranimo po nekajurnem namakanju.

Vrsta	Predhodno vlaženje pri 20 °C		Obarvanje			Vrednotenje		
	Tip	Najkrajši čas (h)	Priprava pred obarvanjem	Koncentracija (%)	Optimalni čas pri 30 °C (h)	Priprava na vrednotenje in tkivo, ki ga opazujemo	Največja dovoljena površina neobarvanega, ohlapnega ali nekrotičnega tkiva	Opombe
Fraxinus spp.	Odstranimo perikarp.*		Odrežemo semensko ovojnico z obeh robov, da sta vidni dve polovici endosperma.	1	18–24*	Izpostavimo zarodek tako, da endosperm razdelimo na dve polovici.	Nič, razen majhne nekroze na endospermu, stran od zarodka.	* Za sveže nabrana semena je potrebno le 8–10 ur.
	V	18						
Fraxinus spp.	Odstranimo perikarp suhega semena.*		Na obeh straneh z vzdolžnim rezom odstranimo majhen košček, da odpremo votlino z zarodkom.	1	18*	Izpostavimo zarodek tako, da endosperm razdelimo na dve polovici.	Nič, razen majhne nekroze na endospermu, stran od zarodka.	* Za sveže nabrana semena je potrebno le 8 ur.
	V	18						
Pinus nigra	Pripravimo suho seme.		Prečno prerežemo 1/3 od distalnega konca 1 endosperma, da odpremo votlino z zarodkom.	1	18	Zarodek in endosperm izvlečemo iz semenske ovojnice.	Nič, vključno z endospermom, razen majhne površinske nekroze na zunanjem delu endosperma, ki ni povezan z votlino zarodka.	Zarodki, krajši od 1/3 votline zarodka, niso življenjsko sposobni.
Prunus spp.	Zdrobimo koščice in odrežemo majhen košček kličnega lista na distalni strani ali zarezemo v seme.		Odstranimo semensko ovojnico, namočimo in vsaj 5 ur vsako uro zamenjamo vodo.	1; 0,5	8–12; 12–18	Razmaknemo klične liste.	Vrh radikule, 1/3 distalne ploskve kličnih listov, če je stanje površinsko.	* Pri vrstah z velikim semenom je za obarvanje potrebno več časa (24 h).
	V	18						
	Zdrobimo koščice.							
	V	18						
	Po potrebi zamenjamo vodo (če ima vonj po grenkih mandljih).		Odstranimo semensko ovojnico.**	1	18	Razmaknemo klične liste.	Vrh radikule, 1/3 distalne ploskve kličnih listov, če je stanje površinsko.	* Pri vrstah z velikim semenom je za obarvanje potrebno več časa (24 h). ** Klične liste razmaknemo previdno pri: <i>Prunus persica</i> , <i>Prunus domestica</i> .

Pomen kratic:

V – v vodi;

MP + V – počasno vlaženje, ki mu sledi vsaj 2–3 ure namakanja v vodi, da dosežemo popolno prepojenost vseh semen.

6.4 Analize DNK

6.4.1 Ekstrakcija DNK

Uspeh vseh molekularnih genetskih analiz je neposredno odvisen od kakovosti in količine njihove tarče, DNK. Zato moramo veliko pozornosti posvetiti postopku izolacije DNK, s katerim zagotovimo, da kakovost in količina izolirane DNK dosežeta raven, ki je potrebna za uspešno izvedbo nadaljnjih analiz.

To poglavje se ne osredotoča na pregled številnih obstoječih protokolov za izolacijo DNK iz rastlinskega tkiva – teh je veliko preveč. Predstavljeni so pristopi, ki jih uporabljajo ali so jih uspešno testirali laboratoriji, vključeni v projekt LIFE GENMON.

DNK zadostne kakovosti in količine je mogoče uspešno izolirati tako s tržno dostopnimi kompleti za ekstrakcijo DNK na osnovi kolon kot s tradicionalnimi laboratorijskimi protokoli na osnovi interno pripravljenih raztopin reagentov.

6.4.1.1 Količina rastlinskega tkiva, potrebna za ekstrakcijo DNK

Optimalna količina rastlinskega tkiva, potrebna za ekstrakcijo DNK, je odvisna od postopka ekstrakcije DNK. Priporočljivo je, da uporabimo količino, ki jo navaja proizvajalec tržnih kompletov za izolacijo DNK ali avtorji tradicionalnih protokolov za izolacijo DNK. Čeprav je to na prvi pogled protislovno, ima lahko uporaba večje količine rastlinskega tkiva od priporočene negativen vpliv na pridobljeno količino in zlasti na kakovost (čistost) izolirane DNK. V nekaterih primerih lahko dobimo boljše rezultate, če uporabimo več materiala, vendar moramo to najprej preveriti na manjšem številu vzorcev, saj so rezultati odvisni od vrste rastline in uporabljenega tkiva.

Tehtanje tkiva vsakega vzorca je lahko zamudno, zlasti če delamo z veliko vzorci naenkrat. Za zmanjšanje delovne obremenitve in skrajšanje časa, potrebnega za to opravilo, lahko uporabimo poenostavljene pristope (glej okvir 6.3: »Alternativne enote« za merjenje mase rastlinskega tkiva za ekstrakcijo DNK).

Okvir 6.3: »Alternativne enote« za merjenje mase rastlinskega tkiva za ekstrakcijo DNK

1. V naključnem podnaboru vzorcev (10–15) preštete število »alternativnih enot«, ki ustrezajo priporočeni količini (masi) rastlinskega tkiva za vsakega od testnih vzorcev; primeri »alternativnih enot«: a) iglavci: iglice; b) listavci: krožci enakega premera, ki smo jih iz listov izrezali z luknjalnikom (glej Sliko 6.3); c) brsti: brsti.



Slika 6.3: (a) Iz posušenih listov navadne bukve se z luknjalnikom izrežejo krožci; (b) število krožcev, ki ustreza zahtevani masi rastlinskega materiala, se vstavi v epruvete za ekstrakcijo DNK. Tehtanje posameznih vzorcev tako ni potrebno. (Fotografije: Mark Walter)

2. Izračunajte povprečno število »alternativnih enot«, ki ustreza priporočeni masi rastlinskega tkiva.
3. Za vzorce, ki bodo analizirani, namesto tehtanja uporabite povprečno število »enot«. Pazite, da vselej izberete primerljive enote – iglice in liste približno enake velikosti; upoštevajte starost analiziranih rastlin in stopnjo zrelosti uporabljenega tkiva – listi mladih rastlin in ne povsem zreli listi so tanjši od listov odraslih dreves, zato je potrebnih več »enot«, da dosežemo zahtevano maso. Vrednost določite za vsako vrsto, starostno skupino in vrsto tkiva posebej.

S standardizirano količino tkiva se zmanjšajo razlike v količini in čistosti izolirane DNK med vzorci.

6.4.1.2 Drobljenje rastlinskega tkiva

Za uspešno izolacijo DNK iz rastlinskega tkiva je ključno dobro drobljenje tkiva. Drobnejši kot so delci tkiva, boljša je difuzija reagentov vanje. V Preglednici 6.6 so povzeti različni pristopi za drobljenje rastlinskega tkiva.

Preglednica 6.6: Pristopi za drobljenje rastlinskega tkiva. ročno – vključuje uporabo terilnice in pestila ali 1,5/2,0-ml epruвет in mikropestil; kroglice/mlin – drobljenje s krogličnim mlinom in drobilnimi kroglicami; pufer – pomeni prvi pufer, ki se uporablja v protokolu izolacije DNK za stabilizacijo DNK in inhibicijo encimske (nukleolitične) aktivnosti.

Stanje tkiva	Pufer	Ročno	Kroglice/mlin	Opombe
Sveže	+	+	-	
Sveže	-	+	-	1
Sveže	+	-	+	2
Zamrznjeno (tek. N ₂)	-	+	-	
Zamrznjeno (tek. N ₂)	-	-	+	
Posušeno	-	-	+	
Posušeno	-	+	-	3

¹ Ni priporočljivo, saj pri drobljenju počijo membrane celic in organelov, zato so nukleinske kisline izpostavljene nukleazam.

² Gibanje drobilnih kroglic skozi pufer povzroči dvig temperature zaradi trenja ter močne strižne sile, ki lahko fragmentirajo DNK.

³ Pri ročnem drobljenju posušenega rastlinskega tkiva moramo biti še posebej previdni, da ne pride do navzkrižne kontaminacije vzorcev, saj je v odprtih sistemih težko nadzorovati razširjanje praškastih delcev posušenega tkiva.

V splošnem je uporaba krogličnega mlina ali podobne električne naprave za drobljenje priporočljivejša od ročnega drobljenja, ker: a) je veliko bolj časovno učinkovita, saj omogoča hkratno obdelavo številnih vzorcev – do 192 vzorcev s 96-jamičnimi ploščami; b) omogoča enotnejše pogoje drobljenja ter manj razlik med vzorci in zaporednimi drobljenji.

Drobljenje posušenega tkiva ali tkiva, zamrznjenega v tekočem dušiku, je priporočljivejše od drobljenja svežega tkiva. Če uporabljate tkivo, zamrznjeno v tekočem dušiku, poskrbite, da med postopkom drobljenja ne pride do prevelikega dviga temperature, ter uporabljajte samo opremo in potrošni material, ki sta zasnovana za tako nizko temperaturo.

6.4.1.3 Protokoli za ekstrakcijo DNK

Protokoli za ekstrakcijo DNK, ki so bili uporabljeni v projektu LIFE GENMON ali so jih laboratoriji, vključeni v projekt, uspešno testirali, so predstavljeni v Preglednici 6.7. Omeniti je treba, da obstajajo številni različni protokoli za ekstrakcijo DNK iz rastlinskih tkiv, ki dajejo dobre rezultate glede na količino in kakovost DNK, v obliki tržno dostopnih kompletov ter tradicionalnih laboratorijskih protokolov.

Večina tradicionalnih protokolov za ekstrakcijo DNK iz rastlinskega tkiva temelji na protokolu na osnovi CTAB, ki sta ga najprej opisala Doyle in Doyle (1987), ali na protokolu na osnovi SDS, ki so ga opisali Dellaporta in sod. (1983). Različne prilagoditve in uporabe omenjenih protokolov so pregledali in povzeli Demeke in Jenkins (2010) ter Nishiguchi in sod. (2002).

Na trgu so dostopni številni kompleti za ekstrakcijo DNK iz rastlinskega tkiva na osnovi kolon. Na te komplete se z dobrimi rezultati opirata laboratorija za gozdno genetiko AUTH in GIS.

Tako tradicionalni laboratorijski protokoli kot tržno dostopni kompleti imajo svoje prednosti in pomanjkljivosti. Izbira protokola za ekstrakcijo DNK je odvisna zlasti od preferenc posameznega laboratorija. Priporočljivo je, da laboratoriji za molekularno genetiko, ki se želijo vključiti v gozdni genetski monitoring, še naprej uporabljajo protokole za ekstrakcijo DNK, ki jih dobro poznajo in vedno znova dajejo dobre rezultate.

Preglednica 6.7: Protokoli za ekstrakcijo DNK, ki jih za ekstrakcijo DNK iz rastlinskega tkiva uporabljajo laboratoriji, vključeni v projekt LIFE GENMON. AWG – Bavarski urad za gozdno genetiko, Nemčija; AUTH – Aristotelova univerza v Solunu, Grčija; GIS – Gozdarski inštitut Slovenije; LN₂ – tekoči dušik.

Laboratorij	Priprava vzorcev	Drobljenje tkiva	Ekstrakcija DNK
AWG	Sušenje, silikagel	Kroglični mlin, posušeno	Prilagojeni protokol CTAB
AUTH	Zamrzovanje	Ročno, zamrznjeni v LN ₂	Macherey-Nagel, komplet NucleoSpin Plant II Kit
GIS	Sušenje, liofilizacija	Kroglični mlin, posušeno	Qiagen, komplet DNeasy Plant 96 Kit

6.3.1.4 Količina, čistost in integriteta DNK

Ne glede na protokol za ekstrakcijo DNK je pomembno, da ocenimo količino in kakovost ekstrahirane DNK. Ob testiranju novega protokola je to še posebej pomembno, redno pa moramo to storiti tudi ob vsaki ekstrakciji DNK – vsaj na podnaboru vzorcev, najbolje pa za vse vzorce. Tako lahko koncentracije DNK standardiziramo, kar močno olajša nadaljnje analize (Guichoux in sod. 2011). Količino in čistost DNK se običajno ugotavlja s spektrofotometrično analizo vzorcev DNK. Izmeri se absorbanca pri 230 nm, 260 nm in 280 nm. Maksimalna absorpcija DNK je pri 260 nm, valovni dolžini 230 in 280 nm pa sta namenjeni oceni ostankov nečistoč z izračunom razmerij absorbance 260 nm/230 nm in 260 nm/280 nm (podrobnosti so v Preglednici 6.8). Načeloma je zelena koncentracija DNK približno 100 ng/μl, vendar je odvisna od vrste uporabljenega tkiva. Natančnost merjenja čistoče DNK glede na absorbanco je odvisna od njene koncentracije. Pri koncentracijah pod 50 ng/μl sta razmerji A260/280 in A260/230 precej spremenljivi, zato je merjenje priporočljivo opraviti v vsaj 3 ponovitvah (Koetsier in Cantor 2019). Meritve absorbance so občutljive tudi na pH-vrednost raztopine. Kisle raztopine DNK imajo običajno nižje vrednosti razmerja A260/280, medtem ko je pri bazičnih raztopinah DNK vrednost razmerja A260/280 običajno precenjena (Wilfinger in sod. 1997).

Poleg količine in čistoče DNK je priporočljivo oceniti tudi integriteto ekstrahirane DNK. Ocenimo jo lahko z elektroforezo v 1-odstotnem agaroznem gelu. Dobro ekstrakcijo DNK z visoko kakovostjo pridobljene DNK nakazuje intenziven pas DNK, velikosti nad 10 kbp, z zelo malo razmazanosti.

Preglednica 6.8: Razlaga vrednosti razmerij absorbance 260/280 nm in 260/230 nm za vzorce ekstrahirane DNK.

Razmerje absorbance	Razmerje absorbance za čisto DNK	Nizka vrednost razmerja absorbance	Visoka vrednost razmerja absorbance
260/280 nm	~ 1,8	Proteinske nečistoče	Visoka koncentracija RNK (> 15 % celokupnih nukleinskih kislin)
		Fenoli (prenos iz postopka ekstrakcije DNK ali ostanek nečistoč iz rastlinskih tkiv – polifenoli)	
260/230 nm	2,0–2,2	Zelo nizka koncentracija DNK	Različna koncentracija prostega EDTA v slepem vzorcu in vzorcu ekstrahirane DNK lahko povzroči razmerje A260/230 nad 3,0.
		Polisaharidi (pogost problem pri rastlinskih tkivih)	
		Fenoli (prenos iz postopka ekstrakcije DNK ali ostanek nečistoč iz rastlinskih tkiv – polifenoli)	
		Ostanki kaotropnih soli (na primer gvanidina, ki se pogosto uporablja v kompletih za ekstrakcijo DNK na osnovi kolon)	

6.4.2 Genetski markerji

6.4.2.1 Izbira genetskih markerjev

Kljub pojavu novih tehnologij se v populacijski genetiki naravnih populacij med markerji še vedno najpogosteje uporabljajo mikrosateliti. Zaradi visoke stopnje mutacij (Whittaker in sod. 2003) so mikrosateliti odlični markerji za preučevanje naslednjih kazalnikov genetskega monitoringa: (i) genetski zdrs in (ii) pretok genov (Selkoe in Toonen 2006). Vendar pa je znano, da so mikrosateliti polni pristranskosti, na primer zaradi izpada alelov in ničelnih alelov (Flores-Rentería in Krohn 2013, Oddou-Muratorio in sod. 2009). Čeprav je na voljo posebna programska oprema za ocenjevanje prisotnosti pristranskosti, se take ocene med seboj le redko ujemajo, zato zbujejo pomisleke glede izgube natančnosti. Eden izmed načinov za omilitev negativnega vpliva takih pristranskosti pred začetkom izvajanja genetskega monitoringa je predhodna preučitev predlaganih markerjev z manjšimi poskusi. Stroški izhodiščne genetske ocene se s tem sicer povečajo, vendar jih povečana zanesljivost ocen lahko odtehta, zlasti na dolgi rok.

Drug sistem genetskih markerjev, ki je na voljo za genetski monitoring, so polimorfizmi posameznih nukleotidov (SNP-ji). Domnevno nevtralni SNP-ji omogočajo zanesljivejšo oceno demografske statistike kot mikrosateliti, saj so razširjeni v več kromosomih in soseskah, zato lahko raziskovalci dobijo bolj reprezentativen vzorec genoma. SNP-ji v območjih genov poleg demografskih ocen omogočajo tudi preučevanje kazalnika »selekcija« z molekularnimi podatki (Brousseau in sod. 2016, Csilléry in sod. 2014, Roschanski in sod. 2016). Čeprav za nekatere vrste obstajajo markerji SSR, povezani s kodirajočimi območji (markerji EST-SSR), majhno število lokusov (običajno 10–20), ki se uporabljajo v večini študij populacijske genetike, ne omogoča odkrivanja osamelcev. Veliki nabori SNP-jev, pridobljenih z naprednejšimi tehnikami, na primer s sekvenciranjem RAD, genotipizacijo s sekvenciranjem in celo sekvenciranjem eksoma, v zadnjih letih postajajo vse pogostejši pri celi vrsti populacijskih študij (Benestan in sod. 2015, Tyrmi in sod. 2020). Vendar bodo majhni nabori SNP-jev, pridobljenih npr. z analizami KASP (Csilléry in sod. 2014, Roschanski in sod. 2016), vsaj še v bližnji prihodnosti verjetno ekonomsko zanimivejši za genetski monitoring gozdnih populacij. Pomanjkljivost analiz tako majhnega obsega je, da so znane po nagnjenosti k pristranskosti ugotovitev. Tak tip pristranskosti je pričakovan v primerih velike genetske oddaljenosti (Nei 1973) med osebkami, ki so bili uporabljeni pri odkrivanju lokusov, in genotipiziranimi vzorci (Albrechtsen in sod. 2010). Za namene genetskega monitoringa na ravni sestoja to nima nujno negativnih posledic, če je nepristranski delež SNP-jev, ki ostanejo v naboru podatkov (tj. polimorfni mest), dovolj velik za natančne izračune demografskih parametrov. Vseeno pa je pri vsaki primerjavi med populacijami z različnih območij in/ali iz različnih evlucijskih linij v okviru geografsko obsežnejšega genetskega monitoringa potrebna previdnost, zlasti če je cilj določiti njihov ohranitveni status. V tem primeru je lahko statistika o raznolikosti pristranska in upravitelje gozdov privede do napačnih odločitev.

Te težave bodo naposled postale manj pomembne, ko bo genetski monitoring prešel na zgoraj omenjene metode vzorčenja genoma, ki so zanesljivejše, čeprav prav tako niso povsem nepristranske (Lowry in sod. 2017). Dolgoročno shranjevanje DNK iz zgodnejših vzorčenj je verjetno najboljšo jamstvo za informativne primerjave s prihodnjimi vzorci.

6.4.2.2 Mikrosatelitni markerji (SSR)

6.4.2.2.1 Izbira ustreznih mikrosatelitnih markerjev (SSR)

Poiščite razpoložljivo znanstveno literaturo za razpoložljive SSR-je in se posvetujte s kolegi iz drugih laboratorijev, ki imajo izkušnje s SSR-ji za zadevne vrste. Pri izbiri ustreznih markerjev SSR iz literature ali razvoju novih je priporočljivo upoštevati naslednja merila:

- SSR-ji s popolnimi ponovitvami imajo prednost pred tistimi z nepopolnimi ponovitvami, saj pri teh ni ujemanja med zaznano dolžino alela in zaporedjem – več alelov enake velikosti ima lahko različno nukleotidno zaporedje (Estoup in sod. 1995). Fragmentna analiza takih razlik ne zazna, zato pri SSR-jih z nepopolnimi ponovitvami ugotovi nižjo stopnjo polimorfnosti (Urquhart in sod. 1994, Estoup in sod. 2001, Gusmão in sod. 2006, Guichoux in sod. 2011).

- Ponavljajoče enote SSR so običajno dolge od 1 do 6 nukleotidov. Najpogosteje se uporabljajo SSR-ji z dinukleotidnimi ponovitvami, ki jih pri multipli verižni reakciji s polimerazo (»multiplex PCR«) tudi lažje uporabimo po več skupaj, saj imajo v splošnem manjši alelni razpon. Vendar pa SSR-ji z dinukleotidnimi ponovitvami pri PCR pogosto proizvedejo več artefaktov, kot so zdrsnih artefakti (*stutter bands*) (Chambers in MacAvoy 2000), kar otežuje določanje alelov (Levinson in Gutman 1987, Meldgaard in Morling 1997). SSR-ji z daljšimi ponovitvami (tri- ali več nukleotidne) so dozdevno občutno manj nagnjeni k nastajanju zdrsnih artefaktov (Edwards in sod. 1991, Flores-Rentería in Krohn 2013) in se včasih prednostno uporabljajo na področjih, kot sta forenzika in ugotavljanje starševstva (Kirov in sod. 2000, Cipriani in sod. 2008).
- Za zagotovitev ustrezne ravni polimorfnosti moramo izbrati lokuse SSR z zadostnim številom ponovitev. Vendar pa imajo lahko SSR-ji s številnimi ponovitvami tudi nekatere neželene lastnosti, na primer več izpadov alelov (Kirov in sod. 2000, Buchan in sod. 2005) in zdrsnih artefaktov (Hoffman in Amos 2005). Srednje število ponovitev je verjetno idealno, saj je dober kompromis, ki omogoča ohranjanje zadostne ravni polimorfizma, hkrati pa se izognemo nekaterim pomanjkljivostim zaradi visoke stopnje mutacij. Van Asch in sod. (2010) za najboljše rezultate priporočajo uporabo lokusov SSR z 12–16 ponovitvami.
- Ko med objavljenimi študijami izbirate markerje SSR, izberite tiste, pri katerih navedena frekvenca ničelnih alelov ni višja od 10 % ali je po možnosti še nižja (Oddou-Muratorio in sod. 2009).
- Če so na voljo genetske karte, izberite SSR-je iz čim več različnih kromosomov.
- Osredotočite se na SSR-je, ki so bili uspešno uporabljeni na čim večjem številu vzorcev in na vzorcih iz različnih delov območja razširjenosti vrste, saj bo to zmanjšalo možnost pristranskosti ugotovitev.
- Če preučujete vrsto na območju, kjer naj bi potekala hibridizacija, poskrbite, da boste izbrali markerje, ki so bili uspešno testirani na tarčnih hibridizirajočih vrstah. Priporočamo, da izvedete teste na vzorcih obeh vrst, da preverite in potrdite učinkovitost uporabljenih SSR-jev. Odsotnost alelov ali visoka stopnja ničelnih alelov kaže na težave s prileganjem začetnih oligonukleotidov (mutacije v območju prileganja začetnih oligonukleotidov poleg SSR pri eni izmed vrst) – takih SSR-jev ne uporabimo ali na novo zasnujemo začetne oligonukleotide.
- Ker je zaželeno, da v posamezni multipli PCR kombiniramo čim več markerjev SSR, moramo upoštevati temperature prileganja začetnih oligonukleotidov in alelne razpone markerjev. Markerje s prekrivajočimi se alelnimi razponi moramo označiti z različnimi fluorofori ali pomnožiti s PCR ter jih analizirati v ločenih reakcijah. Poleg tega je najbolje, da se temperature prileganja (T_m) začetnih oligonukleotidov v posamezni multipli PCR ne razlikujejo za več kot 2–3 °C, vsekakor pa ne za več kot 5 °C (Butler in sod. 2005a, Guichoux in sod. 2011, Hill in sod. 2009).
- Skupno število uporabljenih SSR-jev bo odvisno od specifičnega vprašanja, ki ga zastavljamo, od razpoložljivih virov ter od značilnosti posameznih SSR-jev (polimorfizem). V študijah populacijske genetike se običajno uporablja od 10 do 25 SSR-jev.
- Vselej začnite z večjim številom potencialnih SSR-jev, če nekateri izmed njih ne bi delovali po pričakovanjih.

6.4.2.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Pomnoževanje markerjev SSR se prednostno izvaja v multiplih PCR (Chamberlain in sod. 1988, Edwards in Gibbs 1994), saj tak pristop močno povečuje zmogljivost ter hkrati znižuje stroške in količino dela na posamezen vzorec (Elnifro in sod. 2000, Lederer in sod. 2000, Galan in sod. 2003, Renshaw in sod. 2006).

Cilj multipleksiranja je združiti želeno število markerjev SSR (običajno od 10 do 25) v čim manj reakcijah PCR, pri čemer se vsakemu markerju dodeli določeno fluoroforno barvilo. Multipla PCR je občutljiva tehnika. Za razvoj učinkovitih in zanesljivih multipleksov moramo vzeti v obzir številne spremenljivke (Guichoux in sod. 2011), začenši z izbiro ali razvojem začetnih oligonukleotidov. Specializirani tržno dostopni kompleti za multiplo PCR (na primer Qiagen Multiplex PCR Kit, KAPA Biosystems KAPA2G Fast Multiplex Mix in drugi) močno olajšajo optimizacijo multipleksov PCR.

Alelni razponi markerjev, označenih z istim fluoroforom, se ne smejo prekrivati. Markerje, pri katerih se alelni razponi prekrivajo, lahko v enem multipleksu kombiniramo le, če so označeni z različnimi fluorofori. Število in vrsta različnih fluoroforov (različne barve fluorescence), ki jih lahko uporabimo, sta odvisna od analizatorja s kapilarno elektroforezo. Običajno se njihovo število giblje od 4 do 6, pri čemer je en barvni kanal vedno dodeljen notranjemu velikostnemu standardu.

Temperature prileganja uporabljenih začetnih oligonukleotidov naj bodo visoke, najbolje 58 °C ali več, brez prevelikih razlik med pari začetnih oligonukleotidov (Butler in sod. 2005a, Hill in sod. 2009, Qiagen 2010).

Za zagotovitev uspešne sočasne pomnožitve različnih markerjev SSR je bistveno, da začetne oligonukleotide preverimo z vidika potencialnega nastanka sekundarnih struktur, dimerizacije ter interakcij z drugimi začetnimi oligonukleotidi v multipleksu (Vallone in Butler 2004, van Asch in sod. 2010). Za lažje načrtovanje optimalne rešitve za multipleksiranje ob upoštevanju predhodnih informacij o markerjih so bili razviti prosto dostopni računalniški programi, na primer Multiplex Manager v1.2 (Holleley in Geerts 2009).

Količina matrične DNK, ki se uporabi pri vsaki reakciji PCR, je ključnega pomena in mora biti standardizirana. Čeprav lahko premajhna količina DNK povzroči nizko intenziteto signala, neravnovesja med posameznimi markerji in izpad alelov, je prevelika količina matrične DNK običajno bolj problematična (Livingstone in sod. 2009, Guichoux in sod. 2011). Prevelika količina matrične DNK lahko povzroči previsok fluorescentni signal s povezanimi učinki prelivanja (»pull-up«), neravnovesja med posameznimi markerji, dvojne vrhove (»split peaks«) in večje število zdrsnih artefaktov (Kline in sod. 2005). Priporočena koncentracija matrične DNK pri multipli PCR je od 0,5 do 4 ng/μl.

Optimalno temperaturo prileganja za multiplo PCR je treba določiti empirično. Kot izhodišče uporabite T_m para začetnih oligonukleotidov z najnižjo T_m . Naprave za PCR s funkcijo temperaturnega gradienta močno pospešijo fazo optimizacije temperature prileganja, saj lahko hkrati testiramo do 6 različnih temperatur.

Priporočljivo je, da začetne oligonukleotide za vsak marker SSR najprej posamično testiramo (in potrdimo) z enojno PCR na reprezentativnem naboru vzorcev, zlasti če smo začetne oligonukleotide zasnovali na novo. Najbolje je, da uporabimo vzorce, ki so reprezentativni za genetsko raznolikost (zajemajo različne populacije) preučevanih vrst (ali populacij), in se tako izognemo poznejšim težavam s pristranskostjo ugotovitev ter zaobjamemo čim več različnih alelov. Markerje SSR, ki izkazujejo visoko raven ničelnih alelov, prekomerno nastajanje zdrsnih artefaktov, dvojne vrhove in/ali druge artefakte, moramo zavreči ali pa moramo že na stopnji enojne PCR na novo zasnovati začetne oligonukleotide za njihovo pomnoževanje (Guichoux in sod. 2011). Markerje, ki so uspešno prestali posamično testiranje, nato testiramo v multipli PCR na istem naboru vzorcev. Rezultate – podatke o genotipu – iz enojnega in multiplega pomnoževanja nato primerjamo ter multiplekse nadalje optimiziramo (problematične markerje bo morda treba zavreči), dokler ne dajejo učinkovitih in ponovljivih rezultatov.

Tudi če dajejo markerji pri enojni PCR dobre rezultate, multiplo pomnoževanje pogosto ne bo optimalno. Spodaj so navedeni najpogostejše težave in priporočila, kako pristopiti k njihovem reševanju.

- a. **Neravnovesje med posameznimi markerji** je posledica razlik v učinkovitosti pomnoževanja različnih markerjev v isti multipli PCR, kar povzroča različno intenziteto signala posameznih markerjev. Sodobni genetski analizatorji imajo detektorje fluorescence s širokim dinamični razponom, ki omogočajo zanesljivo zaznavanje signalov zelo različnih intenzitet. Vendar pa večja enotnost signala pomeni zanesljivejše in preprostejše branje elektroferogramov. Neravnovesje med posameznimi markerji pogosto povzročajo razlike med T_m različnih začetnih oligonukleotidov v multipleksu. To težavo lahko ublažimo s protokoli PCR s padajočo temperaturo (»touch-down PCR«) (Rithidech in Dunn 2003, Renshaw in sod. 2006). Če T_m ni vzrok za ugotovljeno neravnovesje pomnoževanja, lahko težavo odpravimo tako, da prilagodimo koncentracijo začetnih oligonukleotidov – pri markerjih z najšibkejšim signalom jo povečamo in/ali jo zmanjšamo pri tistih z najmočnejšim signalom.
- b. **Nastajanje zdrsnih artefaktov (»stutter bands«)** je pogost pojav in je posledica pomnoževanje produktov PCR, ki se od dejanskega alela razlikujejo za eno ali nekaj ponovitev. Nastanejo kot rezultat zdrsa DNK-polimeraze (Levinson in Gutman 1987, Meldgaard in Morling 1997). Zdrsi artefakti so običajno krajši od

dejanskega alela. Obstaja več pristopov za zmanjšanje nastajanja zdrsnih artefaktov: i) znižanje denaturacijske temperature na 83 °C (Olejniczak in Krzyzosiak 2006); ii) aditivi za PCR, na primer goveji serumski albumin (BSA), formamid ali dimetil sulfoksid; iii) uporaba specializiranih kompletov za multiplo PCR in/ali spremenjenih polimeraz nove generacije, npr. fuzijskih vrst (Fazekas in sod. 2010); iv) sprememba začetnih oligonukleotidov z vključitvijo dela mikrosatelitnega območja (Flores-Rentería in Whipple 2011); v) uporaba SSR-jev z ponavljajočimi enotami, daljšimi od 2 nukleotidov. V splošnem nizko ali zmerno število zdrsnih artefaktov ne predstavlja posebnih težav za natančno določitev alelov in njihove velikosti, lahko pa pomeni več dela z ročnim preverjanjem rezultatov samodejnega določanja velikosti alelov.

- c. **Dvojni vrhovi (»split peaks«; vrhovi N-1).** Dvojni vrhovi nastanejo zaradi nepopolnega nematričnega dodajanja adenina na 3' konce pomnožkov PCR s strani *Taq* polimeraze, kar povzroči dvojne vrhove – »fragment DNK, skladen z matrico« ter dodaten vrh, daljši za 1 bp, ki ustreza adeniliranemu fragmentu. Dvojni vrhovi lahko motijo samodejno prepoznavanje vrhov, zlasti pri heterozigotih z bližnjimi aleli. Popolno adenilacijo in s tem zmanjšanje intenzivnosti nastajanja dvojnih vrhov lahko dosežemo z i) zmanjšanjem količine matrične DNK na 10 ng (Lederer in sod. 2000, Butler 2005b); ii) zmanjšanjem koncentracije začetnih oligonukleotidov; iii) zmanjšanjem števila ciklov PCR ali iv) uporabo drugih vrst DNK-polimeraz (Hu 1993, Vallone in sod. 2008).
- d. **Dimeri začetnih oligonukleotidov in drugi artefakti pasovi.** Pri multipli PCR lahko nastanejo različni artefakti, vključno s takimi, ki so posledica komplementarnosti delov zaporedij v začetnih oligonukleotidih iz istega para ali začetnih oligonukleotidih za različne markerje (Brownie in sod. 1997, Hill in sod. 2009). Artefakti v obliki dodatnih pasov lahko nastanejo zaradi nespecifičnega prileganja začetnih oligonukleotidov ali pomnožitve psevdogenov. Z uvedbo strožjih pogojev za PCR (višja temperatura prileganja, krajši čas prileganja) lahko včasih omejimo nastajanje artefaktov, vendar je previdnost pri sami zasnovi začetnih oligonukleotidov in načrtovanju multiple PCR najboljše jamstvo za preprečitev njihovega nastanka. Če artefakti ne motijo določanja alelov, jih lahko pri določanju preprosto izpustimo, a včasih je najbolje, da take markerje izključimo iz multipleksa ali pa na novo zasnujemo začetne oligonukleotide za njihovo pomnoževanje (Guichoux in sod. 2011).

Čeprav so multipleksi SSR, ki jih navaja literatura, dobro izhodišče, navedeni pogoji in protokoli za izvajanje PCR redko že takoj dajejo dobre rezultate. Pričakovati moramo, da bo potrebno vsaj nekaj optimizacije, preden bomo lahko multipleksirano analizo SSR-jev opravljali rutinsko in z visoko zmogljivostjo.

6.4.2.2.3 Fragmentna analiza

Fragmentna analiza markerjev SSR obsega pripravo s PCR pomnoženih vzorcev, nato ločitev in zaznavanje pomnožkov PCR na avtomatizirani platformi s kapilarno elektroforezo z visoko ločljivostjo (tj. sekvenator ali genetski analizator) ter analizo surovih podatkov – določanje velikosti alelov in določanje razpona velikosti posameznega alela. Če nikjer ne piše drugače, spodaj navedene informacije temeljijo na uporabniških priročnikih in protokolih za analizo, ki so jih razvili proizvajalci (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific 2010, 2014) sistemov kapilarne elektroforeze, ter na protokolih in dejanskih izkušnjah laboratorijev, ki sodelujejo pri projektu LIFEGENMON.

a. Razredčitev s PCR pomnoženih vzorcev

Sodobni genetski analizatorji imajo izjemno občutljiva tipala za zaznavanje fluorescence, zato je treba koncentracijo pomnožkov PCR, označenih s fluoroforom, pogosto razredčiti, da fluorescenca ustreza priporočenemu razponu zaznavanja. Vzorci s previsokimi koncentracijami lahko vplivajo tudi na intenziteto signala in ločljivost ter lahko zamašijo kapilare, zato jih je treba preprečiti. Raven razredčitve je odvisna od občutljivosti in razpona zaznavanja genetskega analizatorja, uspešnosti pomnoževanja in števila ciklov pomnoževanja markerjev SSR v PCR ter uporabljenih fluoroforov, določiti pa jo je treba empirično za vsak multipleks. V splošnem potrebujemo do 100-kratne razredčitve. Razredčitve je treba optimizirati tako, da je razmerje med povprečnim vzorcem in intenziteto vrhov velikostnega standarda od 3 : 1 do 1 : 1. Pomnožke PCR je mogoče razredčiti v formamidu ali vodi za molekularno biologijo (brez nukleinskih kislin ter brez DNaz in RNaz). Razredčene vzorce je treba čim prej obdelati in jih čim manj izpostavljati svetlobi iz okolja, da preprečimo »beljenje« (»bleaching«) fluoroforov.

b. Denaturacija razredčenih vzorcev

Denaturacija pomnožkov PCR je obvezna, ker med elektroforezo samo enoverižna DNK (ssDNA) migrira v korelaciji z velikostjo fragmentov. Razredčene pomnožke PCR združimo z notranjim velikostnim standardom v formamidu in jih inkubiramo pri 95 °C od 3 do 5 minut, da dosežemo popolno denaturacijo fragmentov dvoverižne DNK. Na voljo so različni velikostni standardi, ki ustrezajo različnim razponom velikosti fragmentov DNK. Paziti je treba, da izberemo velikostni standard, ki sega čez celoten razpon velikosti alelov analiziranih markerjev SSR. Upoštevajte navodila proizvajalca za priporočena razmerja komponent denaturacijske mešanice, npr. formamida, vzorca in velikostnega standarda. Formamid se ob stiku z vodo hidrolizira v mravljinčno kislino in formiat, zato se zmanjša njegova zmožnost denaturacije. Poleg tega se formiatni ioni med elektrokinetičnim injiciranjem učinkoviteje premikajo v kapilare kot fragmenti DNK in povzročijo izgubo intenzitete signala. Formamid je treba hraniti pri temperaturi -20 °C in ga ne zamrzniti/odtajati več kot dvakrat. Priporočljivo je pripraviti alikvotne formamida, da se izognemo degradaciji. Denaturirane pomnožke PCR je najbolje takoj analizirati, saj intenziteta signala med shranjevanjem slabi. Denaturiranih vzorcev ne smemo hraniti pri sobni temperaturi več kot 24 ur, pri temperaturi od 2 do 8 °C več kot 5 dni ali pri temperaturi -20 °C več kot 1 teden.

c. Kapilarna elektroforeza

Pri večini sodobnih genetskih analizatorjev je elektroforetično ločevanje fragmentov DNK izjemno avtomatizirano in platforme zahtevajo zelo malo človekovega sodelovanja razen tega, da je treba vstaviti pladnje z denaturiranimi vzorci, naložiti ali ustvariti seznam vzorcev in izbrati ustrezen protokol izvajanja. Tudi programska oprema za upravljanje, priložena genetskim analizatorjem, je na voljo s protokoli izvajanja, optimiziranimi za različne vrste analiz. Glede na uporabljen genetski analizator je po navadi na voljo delna optimizacija injiciranja vzorca in razmer za izvajanje elektroforeze (čas injiciranja in izvajanja, napetost injiciranja in elektroforeze), ki lahko izboljša kakovost podatkov, natančnost med posameznimi analizami in/ali hitrost obdelave. Laboratoriji pa morajo biti previdni, kadar se odločajo za take posege, ter morajo preveriti ustrezne tehnične dokumente in/ali se posvetovati s pooblaščenimi predstavniki tehnične podpore, preden se odločijo spreminjati razmere za elektroforezo. Poleg tega je potrebno spremenjene protokole izvajanja temeljito validirati, da se zagotovijo optimalni rezultati.

Čas injiciranja vpliva na intenziteto signala in ločljivost. Z daljšim časom injiciranja lahko izboljšamo intenziteto signala pri vzorcih z nizko koncentracijo pomnožkov PCR, vendar se zaradi daljših časov hkrati zmanjša ločljivost, kar se odraža v zmanjšanem razmerju med višino in širino vrhov. S povečanjem napetosti injiciranja vplivamo na intenziteto signala, vendar ne vplivamo bistveno na ločljivost. Kljub temu so priporočljive nižje napetosti, da zagotovimo točnejši čas injiciranja ter tako izboljšamo ponovljivost nanašanja vzorca pri vseh vzorcih in izvajanjih.

Pri kakršnem koli spreminjanju razmer za elektroforezo je treba upoštevati razpon dolžin fragmentov DNK (razponi velikosti alelov analiziranih markerjev SSR in notranji velikostni standard) in zahtevano ločljivost. Čase izvajanja najpogosteje optimiziramo zato, da povečamo hitrost obdelave. Optimalni čas izvajanja za dano napetost izvajanja je treba določiti s preskusnimi izvajanji. Čas izvajanja elektroforeze mora biti približno 10 % daljši od časa migracije največjega fragmenta DNK, ki nas zanima. V splošnem je treba vključiti vsaj dva fragmenta velikostnega standarda, ki sta krajša od najmanjšega analiziranega fragmenta, vendar hkrati po dolžini najbližje najmanjšemu analiziranemu fragmentu, in dva fragmenta velikostnega standarda, ki sta daljša od najdaljšega analiziranega fragmenta, vendar hkrati po dolžini najbližje najdaljšemu analiziranemu fragmentu, da zagotovimo točno ustvarjanje umeritvenih krivulj za določanje velikosti. S povečanjem napetosti izvajanja elektroforeze skrajšamo čase izvajanja, vendar to ni priporočljivo, saj lahko višje hitrosti premikanja povzročijo slabše ločevanje fragmentov in slabšo ločljivost.

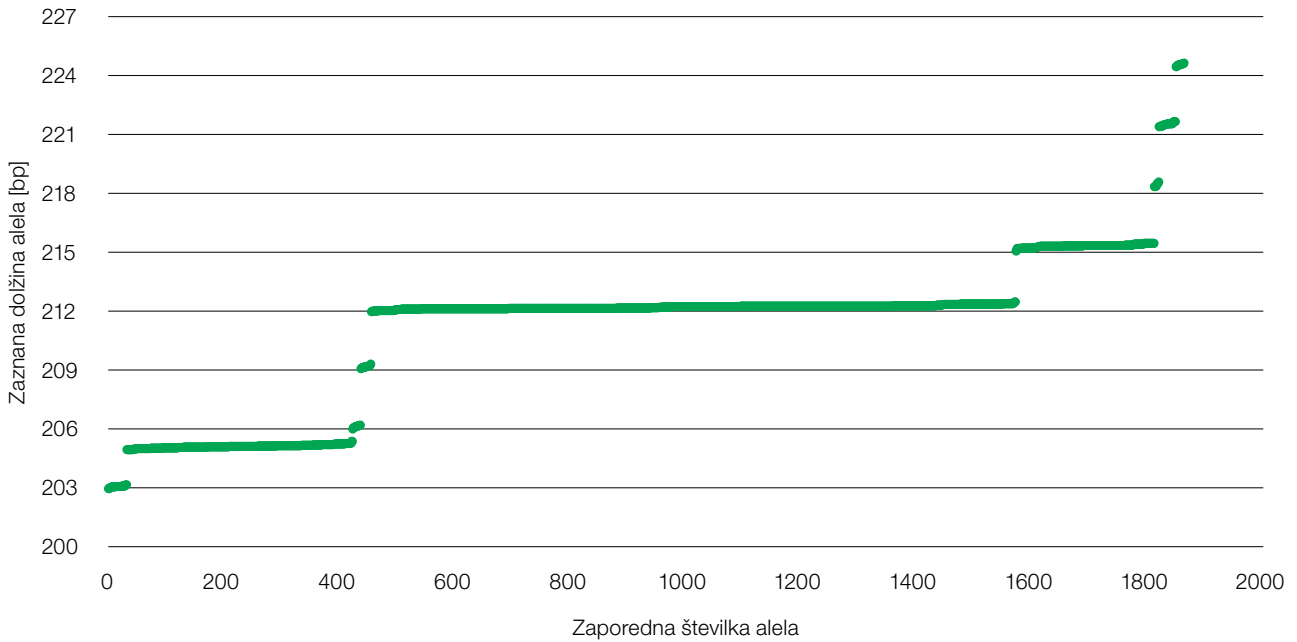
d. Določanje alelov in določanje razpona velikosti posameznega alela

Potem ko genetski analizatorji ustvarijo surove podatke, je treba iz podatkov prebrati ustrezne genotipe. Branje genotipov obsega dva zaporedna koraka: *določanje dejanske velikosti alelov* (velikost alela, izražena kot dejanska (surova) zaznana velikost fragmenta v decimalnih številih) in *določanje razpona velikosti posameznega alela* (dodeljevanje dejanskih velikosti alelov ločenim celoštevilskim enotam, ki se razlikujejo med seboj za velikost ponavljajoče enote) (Idury in Cardon 1997).

Določanje alelov obsega odkrivanje vrhov v elektroferogramu, ki ustrezajo alelom, in določanje njihove dejanske velikosti (dolžine). Programska oprema, priložena sistemom kapilarne elektroforeze, npr. Peak Scanner, MSA in GeneMapper proizvajalca Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific, GenomeLab (Beckman Coulter/Sciex), in programska oprema drugih proizvajalcev, npr. Geneious (Biomatters Ltd.), omogoča visoko stopnjo avtomatizacije določanja alelov in lahko običajno samodejno prepozna in filtrira številne pogoste težave genotipizacije, med drugim vrhove zdrsnih artefaktov, previsoko bazno linijo (šum), »skoke signala« zaradi drobnih delcev ali mikromehurčkov in previsoke vrhove (Guichoux in sod. 2011). Od kakovosti markerjev je odvisno, ali je pri določanju alelov kljub temu morda treba izvesti takšno ali drugačno ročno urejanje. Ročno urejanje je lahko časovno zamudno in že po definiciji vključuje nekaj subjektivnosti in možnosti vnašanja napak, zato je pomembno izbrati dobro delujoče markerje ter čim bolj optimizirati multiplekse in PCR (Scandura in sod. 2006, Guichoux in sod. 2011) ter dosledno upoštevati pravila za ročno urejanje pri vseh markerjih, vzorcih in projektih.

Določanje razpona velikosti posameznega alela kot naslednji korak pri genotipiziranju je ključen korak, poročila pa navajajo, da so nedoslednosti in samovoljne odločitve v zvezi z določanjem razpona velikosti posameznega alela pomemben vzrok napak pri genotipiziranju na podlagi SSR (Ewen in sod. 2000, Weeks in sod. 2002, Morin in sod. 2010). Številni programski paketi, ki so jih razvili proizvajalci sistemov kapilarne elektroforeze, ali programska oprema drugih proizvajalcev omogočajo samodejno določanje razpona velikosti posameznega alela. Vendar je med začetno nastavitveno fazo razponov velikosti posameznega alela priporočljivo preveriti vse razpone velikosti posameznega alela, tj. jih ročno potrditi in po potrebi prilagoditi. Surove podatke z vrednostmi dejanske zaznane velikosti alelov je priporočljivo shraniti za poznejšo uporabo, to pa velja tudi za primerjave. Mejne vrednosti razpona velikosti posameznega alela lahko preprosto, hitro in učinkovito določimo tako, da ustvarimo grafe porazdelitve dejanske velikosti alelov (Slika 6.4). To lahko naredimo tako, da izvozimo podatke o dejanski velikosti fragmentov DNK v preglednico in sortiramo vrednosti po velikosti ter ustvarimo grafe porazdelitve skupnega nabora podatkov o velikosti alelov za vsak marker (Jayashree in sod. 2006, Guichoux in sod. 2011). Razpone velikosti posameznega alela je nato mogoče nastaviti okoli teh porazdelitev velikosti v točkah, v katerih opazimo jasne prekinitve v periodičnih velikostnih razredih. Grafi porazdelitve velikosti alelov se lahko uporabljajo za več dodatnih namenov:

- a. So uporaben vizualni pripomoček za hitro odkrivanje alelov, ki odstopajo od pričakovane periodičnosti ponovitev, tj. »mutirani aleli« ali »različice netipičnih dolžin«. Kadar zaznamo alele netipičnih dolžin, je treba opraviti ročno preverjanje, da ugotovimo, ali je netipična velikost dejanska ali gre morda za rezultat nedoslednega določanja alelov v primeru zdrsnih artefaktov, dvojnih vrhov ali drugih artefaktnih vrhov. V takih primerih je priporočljivo opraviti tudi enojno PCR v optimalnih razmerah, da preverimo, ali netipični fragmenti nastanejo tudi v optimalnih razmerah. Če res nastanejo in tako alelno različico potrdimo pri več različnih osebkih, je tak alel netipičnih dolžin dejanski in ga je treba obravnavati kot edinstven mutirani alel s svojim razponom velikosti posameznega alela.
- b. Omogočajo odkrivanje »alelnega drsenja«, tj. Pojava, ko se zaznan razmik med sosednjimi aleli nekoliko razlikuje od pričakovane dolžine ponovitve – za dinukleotidne SSR-je lahko ta razmik znaša od 1,8 do 2,2 bp (Amos in sod. 2007); poleg tega se lahko zaznan razmik med sosednjimi aleli spreminja v odvisnosti od dolžine alelov.
- c. Uporabimo jih lahko za zaznavanje sprememb v zaznanih velikostih alelov zaradi okvare ali obrabljenosti strojne opreme ali napak in iztrošenosti potrošnega materiala. Grafe porazdelitve dejanske velikosti alelov skupaj z analizo standardnih vzorcev je obvezno uporabiti, če kakor koli spremenimo analizo (zamenjava tipa fluoroforov, ali polimeraze, spreminjanje protokolov za izvajanje PCR ali sestave mešanice za PCR, spreminjanje reagentov za elektroforezo (polimer ali kapilare) ali razmer za elektroforezo, saj lahko ti dejavniki vplivajo na zaznano velikost fragmentov DNK) (Hartzell in sod. 2003, Sgueglia in sod. 2003, Hahn in sod. 2001, Ghosh in sod. 1997). Če zaznamo spremembe v zaznanih velikostih alelov zaradi kakršnega koli zgoraj navedenega spreminjanja, je treba razpone velikosti posameznega alela ustrezno prilagoditi.
- d. Uporabiti jih je mogoče kot sestavni del preverjanja celovitosti podatkov za odkrivanje vrednosti velikosti alelov zunaj pričakovanih mejnih vrednosti (glejte podpoglavje 6.5.4.1).



Slika 6.4: Porazdelitev zaznanih velikosti pomnožkov 1864 alelov za marker s trinukleotidno ponovitvijo Aag01 za *Abies alba* Mill. Večina alelov sledi pričakovani periodičnosti 3 bp, razen alela pri pričakovani velikosti 206 bp, kjer smo zaznali dve različici – pričakovano različico dolžine 206 bp in različico netipične dolžine 205 bp, ki v tej konkretni populaciji predstavlja enega pogostejših alelov. Ročno preverjanje je razkrilo, da prisotnost pričakovane različice in različice netipične dolžine ni rezultat nedoslednega določanja alelov, saj je Aag01 »dobro delujoč« marker brez dvojnih vrhov in zelo šibkimi zdrsnimi artefakti. Poleg tega smo odkrili več osebkov z obema različicama – z različico dolžine 205 bp in različico dolžine 206 bp –, prisotnost obeh različic pa smo zaznali tudi pri odraslih razmnoževalno aktivnih drevesih, semenih in naravnem mladju različne starosti. V tem primeru smo različico dolžine 205 bp obravnavali kot edinstven »mutirani« alel, drugačen od pričakovanega alela dolžine 206 bp.

6.4.2.3 Polimorfizem posameznih nukleotidov (SNP)

6.4.2.3.1 Izbira ustreznih markerjev SNP

Poiščite razpoložljivo znanstveno literaturo za razpoložljive SNP in se posvetujte s kolegi iz drugih laboratorijev, ki imajo izkušnje s povezano platformo za genotipizacijo in zadevnimi vrstami. Pri izbiri ustreznih lokusov SNP iz literature ali razvoju novih je priporočljivo upoštevati naslednja merila:

- Če so na voljo genetske karte, izberite SNP iz čim več različnih kromosomov.
- Osredotočite se na SNP, ki so bili uspešno uporabljeni na čim večjem številu vzorcev in na vzorcih iz različnih delov območja razširjenosti, saj bo to zmanjšalo možnost pristranskosti ugotovitev. Isti nasvet velja v zvezi z referenčnimi vzorci, ki se uporabljajo za razvoj novega nabora SNP.
- Če opazujete vrsto na območju, kjer naj bi potekala hibridizacija, poskrbite, da boste izbrali SNP, ki so bili uspešno testirani na tarčnih hibridizirajočih vrstah. Priporočamo, da teste izvedete na vzorcih obeh vrst, da preverite učinkovitost uporabljenih SNP.
- Glede na raziskovalno vprašanje so lahko najustreznejši SNP, vezani na določen gen, ali nevtralni SNP.
- Vedno začnite z večjim številom potencialnih lokusov SNP, kot jih je po vašem mnenju potrebnih, saj jih bo morda veliko izločenih zaradi manjkajočih vrednosti, odsotnosti variabilnosti (nizka frekvenca redkega alela) ali pristranskosti.
- Skupno število uporabljenih SNP bo odvisno od specifičnega vprašanja, na katerega je treba odgovoriti, in od razpoložljivih virov. Približno 180 nevezanih SNP naj bi bilo na primer dovolj za natančno oceno efektivne velikosti populacije (Waples in Do 2010).

- Če število SNP, ki so na voljo, ne zadošča za raziskovalno vprašanje in ni sredstev za razvoj večjega panela, razmislite o uporabi SNP, odkritih v filogenetsko sorodnih vrstah. Vendar pričakujte visoko stopnjo neuspešnosti.
- Čeprav je prenosljivost SNP med platformami za genotipizacijo na splošno visoka, pričakujte nekaj izgube različic (Semagn in sod. 2014).
- Če uporabljate multipleksno visokozmogljivostno genotipizacijo (npr. genotipizacijo s sekvenciranjem, RAD-seq), poskrbite, da imate dovolj zmogljive računalniške vire za analizo tako velikega nabora podatkov.

6.4.2.3.2 Zahteve glede DNK za analizo markerjev SNP

Zahteve glede DNK za analizo markerjev SNP so odvisne od genotipizacijskega pristopa in/ali uporabljenega ponudnika storitev. V smislu kakovosti se zahtevajo ekstrakti genomske DNK velike čistosti in integritete. Za zagotovitev najboljših rezultatov bi morali imeti ekstrakti DNK razmerji absorbance UV A260/A280 > 1,8 in A260/A230 od 1,8 do 2,0. Za podrobnejšo razlago ocene kakovosti DNK glej podpoglavje 6.4.1.4.

Laboratoriji, vključeni v projekt LIFE GENMON, za analizo markerjev SNP uporabljajo zunanje izvajalce, zato bi morale količinske vrednosti DNK, predstavljene v nadaljevanju, služiti kot splošne smernice, saj so potrebne količine odvisne od vrste analize in ponudnika storitev.

Za analizo SNP z visokozmogljivostnim sekvenciranjem, kot je sekvenciranje RAD, je potrebna skupna količina približno 3 µg DNK s koncentracijo 50–100 ng/µl.

Pri analizi SNP s KASP (kompetitivna alelna specifična verižna reakcija s polimerazo (PCR)) je potrebna količina DNK odvisna od velikosti genoma zadevnega organizma in števila analiziranih markerjev SNP. Za genome v obsegu od 2 do 3,5 Gbp je potrebnih približno 10 ng DNK na marker SNP. Za analizo 200 markerjev SNP bele jelke (*Abies alba*), ki ima genom velikosti približno 30 Gbp, bi to pomenilo 20 µg DNK. Ker je take količine DNK včasih težko pridobiti, je mogoče pred samim KASP izvesti pomnoževanje celotnega genoma, da se zagotovi zadostna količina matrične DNK, čeprav lahko ta predhodni korak pomnoževanja poveča stopnjo napake pri določanju nukleotidov. Za genome velikosti od 2 do 3,5 Gbp zadostuje približno 50 ng genomske DNK za analizo od 500 do 1000 SNP s tehniko KASP s predhodnim pomnoževanjem celotnega genoma s podaljševanjem začetnih ologonukleotidov (»primer extension pre-amplification (PEP)«).

6.5 Analize podatkov

6.5.1 Uvod

Namen gozdnega genetskega monitoringa je oceniti sposobnost gozdne populacije, da preživi, se razmnožuje in se obdrži v razmerah hitrih okoljskih spremembah na dolgi rok (Fussi in sod. 2016). V ta namen je treba v rednih časovnih intervalih spremljati in analizirati verifikatorje in dodatne informacije za tri kazalnike – (1) selekcija, (2) genetska variabilnost in (3) pretok genov/sistem opravevanja – kar vključuje pridobivanje in analizo podatkov terenskih opazovanj, molekularnih in drugih laboratorijskih analiz. Zbiranje/pridobivanje podatkov in analiza morajo biti standardizirani, podatki pa morajo biti na voljo za primerjavo v daljšem obdobju.

Za primerjavo rezultatov v času se za oceno verifikatorjev uporabi in analizira isti nabor genetskih markerjev (npr. mikrosatelitov – nSSR, polimorfizmov enega nukleotida – SNP). Zaradi hitrega tehnološkega razvoja in povečevanja števila razpoložljivih markerjev je pametno shraniti vzorce tkiva in/ali DNK za poznejšo genetsko analizo, da se omogoči primerljivost. Kot dodano vrednost je standardizirane podatke z več ploskev za gozdni genetski monitoring iste drevesne vrste mogoče med seboj primerjati, da se pojasni, ali je določena populacija bolj ali manj uspešna od drugih.

V tem poglavju je opisano pridobivanje in ocenjevanje podatkov, vključno z: (a) vrstami podatkov (terenska opazovanja in meritve, molekularne analize), (b) filtriranjem podatkov, (c) analizo podatkov (R-skripta, razvita

v projektu LIFEGENMON, programska oprema za analizo genetskih podatkov itd.) in interpretacijo vrednosti ter (d) shranjevanjem podatkov. Za zagotavljanje dolgoročno primerljivih rezultatov genetskega monitoringa je pomembno upoštevati opisane postopke, ki so bili standardizirani v okviru projekta LIFEGENMON.

6.5.2 Podatkovna zbirka

Podatkovne zbirke so nabori podatkov, razvrščeni v tabelah in vrsticah, tako kot v programu Microsoft Excel ali podobnih programih, vendar povezani v relacije. Tabele imajo lastno, vnaprej določeno strukturo, ki zagotavlja pravo obliko podatkov na pravem mestu. Uporabnik vnese podatke v podatkovno zbirko na sistematičen in urejen način prek obrazcev. Podatkovna zbirka nato uporabniku omogoča hitro in preprosto pridobivanje pravih podatkov. V primerjavi s programom Microsoft Excel v tabelah zbirk podatkov veljajo običajno zelo stroga pravila o tem, katere podatke je mogoče vnesti in kako, kar je zelo pomembno za izključitev napak pri uporabniškem vnosu. To pa niso edine napake, ki se jim skušamo izogniti z uporabo podatkovne zbirke; Ziemann in sod. (2016) so na primer s programskim pregledom vodilnih revij na področju raziskav genomov dokazali, da je približno ena petina objav z dodanimi sezname genov v Excelu vsebovala napačne pretvorbe imen genov.

6.5.2.1 Podatkovna zbirka LIFEGENMON

Pri gozdnem genetskem monitoringu imamo opravka s številnimi različnimi vrstami podatkov, npr. genetskimi, fenološkimi, meteorološkimi in drugimi terenskimi podatki. Podatkovna zbirka, ki vsebuje vse te vrste podatkov, nam omogoča preprostejše in hitreje ugotavljanje sprememb v času in interpretacijo rezultatov. Pri izbiri podatkovne zbirke je veliko možnosti. V projektu LIFEGENMON sta bila testirana dva sistema upravljanja s podatkovnimi zbirkami: Open Foris in PostgreSQL. Temeljna shema podatkovne zbirke je za oba sistema ista (Slika 6.5). Shema podatkovne zbirke temelji na smernicah, ki so del tega priročnika, in jo je mogoče uporabiti kot predlogo za vnovično ustvarjanje podatkovne zbirke.

Open Foris

Open Foris je nabor brezplačnih in odprtokodnih programskih orodij, ki olajšujejo fleksibilno in učinkovito zbiranje in analiziranje podatkov ter pripravo poročil. Open Foris Collect je glavna vstopna točka za zbrane podatke iz terenskih evidenc. Omogoča hitro, preprosto in fleksibilno pripravo vprašalnika z uporabniku prijaznim vmesnikom za vnos podatkov. Program Collect lahko upravlja z več vrst podatkov, omogoča kompleksna pravila potrjevanja v večjezikovnem okolju. Z uporabniku prijaznim vmesnikom ponuja učinkovito odprtokodno rešitev za raziskovalne projekte s finančnimi omejitvami za profesionalno upravljanje podatkovnih zbirk. Program Open Foris ima tudi orodje Calc, s katerim je mogoče ustvariti R-skripte za avtomatizirano izračunavanje in prikazovanje podatkov iz podatkovne zbirke. Open Foris privzeto temelji na podatkovni zbirki SQLite ali PostgreSQL. Vendar so podatki shranjeni v binarni obliki, kar pomeni, da niso neposredno dostopni s poizvedbami SQL (najprej jih je treba pretvoriti v druge oblike). Včasih je tudi počasen, zlasti kadar vnašamo večje količine podatkov v tabele, kar je pri genetskih podatkih zelo pogosto.

PostgreSQL

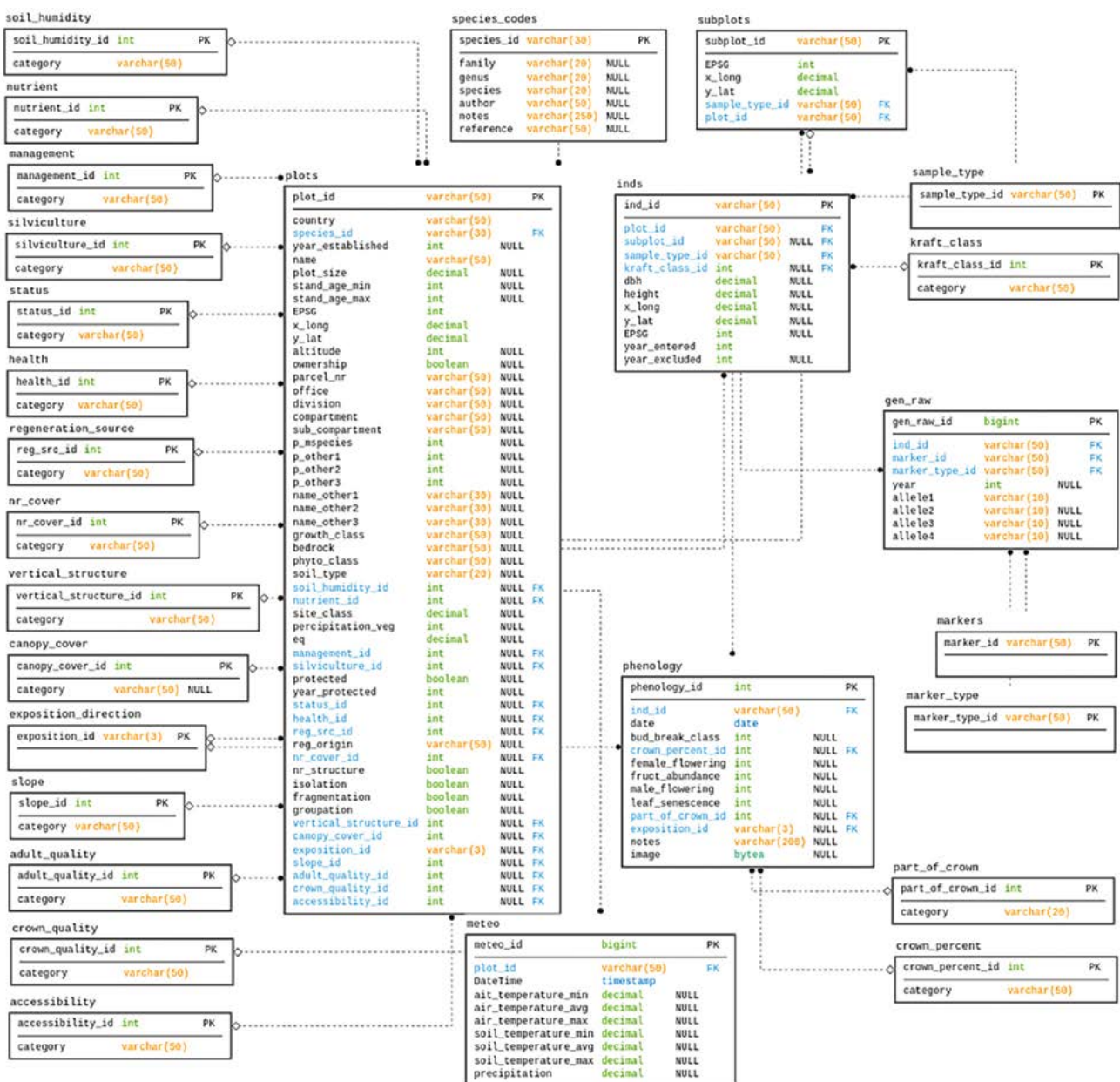
PostgreSQL je brezplačni in odprtokodni sistem upravljanja relacijskih podatkovnih zbirk. Za seboj ima dolgo zgodovino razvoja in je postal zelo znan po zanesljivosti, stabilnih funkcijah in učinkovitem delovanju. Njegove glavne prednosti v primerjavi z orodji Open Foris so hitreje delovanje, stabilnost in neomejene možnosti za uporabniški nadzor, spremembe in interakcije z različnimi programskimi jeziki, npr. s priljubljenimi jeziki za analizo podatkov, kot sta R in Python. V okviru projekta LIFEGENMON je bila ustvarjena aplikacija v jeziku R (easyRpopgen) za prikaz in analizo rezultatov iz podatkov gozdnega genetskega monitoringa (glej podpoglavje 6.5.4.4 o R-skripti). Verjetno trenutno edina manjša prednost Open Forisa v primerjavi s samostojnim sistemom PostgreSQL je vključen uporabniški vmesnik.

V prihodnosti bi se lahko v Open Forisu spremenil način shranjevanja podatkov, podatkovna zbirka PostgreSQL, povezana z uporabniškim vmesnikom v Open Forisu, pa bi bila lahko zelo privlačna možnost, vendar za zdaj

priporočamo uporabo PostgreSQL in po potrebi razvoj uporabniškega vmesnika, ki bo najbolj ustrezal potrebam gozdnega genetskega monitoringa.

6.5.3 Analiza terenskih podatkov

Potencialne verifikatorje selekcije v populaciji je mogoče oceniti na podlagi sprememb demografskih podatkov za populacijo, kot so stopnje mortalitete, številčnost dreves, zraslih iz naravnega pomlajevanja, razmerja med spoloma in porazdelitve starostnih razredov. Na te demografske dejavnike vplivata uspešnost razmnoževanja in sposobnost kohorte, da se prilagodi stresnim dejavnikom, kot so okoljski stresni dejavniki, bolezni in objedanje, zato odražajo pritiske naravne selekcije na populacijo. Oceniti jih je mogoče tudi na podlagi fenologije cvetenja, za katero je bilo ugotovljeno, da je pomembna komponenta, ki vpliva na razmnoževalno sposobnost osebkov (Munguía-Rosas in sod. 2011), in s tem na prilagoditvene strategije, na katere vplivajo evlucijski dejavniki (Kudo 2006).



Slika 6.5: Shematični prikaz zasnove podatkovne zbirke. V tabeli so v prvem stolpcu imena stolpcev, v drugem stolpcu dovoljena vrsta podatkov, npr. int, NULL – to polje je mogoče pri vnosu podatkov izpustiti, PK (»primary key«) – primarni ključ, FK (»foreign key«) – tuji ključ.

6.5.3.1 Preverjanje celovitosti terenskih podatkov

Drevesom na terenu podamo ocene za verifikatorje in dodatne informacije, kot so mortaliteta, obilnost mladja, prsni premer, porazdelitev višinskih razredov in fenološki vzorci (vključno z olistanjem, cvetenjem in senescenco). Terenska ocena teh značilnosti je z vidika zbiranja podatkov izziv. Načeloma napake opazovalca in protokola opazovanja (zbiranja podatkov) povečajo vrednost naravne variabilnosti, opažene v fenotipskih podatkih kot posledica variabilnosti znotraj vrste in vplivov mikroklima ter lahko prispevajo en do dva tedna negotovosti k izmerjenim vrednostim (Schaber in Badeck 2002 ter tam navedena literatura in viri). Privedejo lahko tudi do lažnih ugotovitev, ki se pri določeni metodi ne pričakujejo, kot so nenavadno visoke vrednosti za premer ali višino dreves. Zato morajo biti raziskovalci, ki analizirajo in združujejo podatke, previdni in pozorni, poleg tega pa je treba zbrane podatke temeljito pregledati, ali morda ne vsebujejo napak, ki bi lahko ogrozile njihovo celovitost. Eden od načinov za zagotavljanje celovitosti podatkov tako različnih vrst kot jih najdemo pri gozdnem genetskem monitoringu in s tako različnimi protokoli zbiranja le-teh je uporaba sistema podatkovnih zbirk (glej podpoglavje podatkovna zbirka LIFEENMON).

Osamelci v podatkih so vrednosti, ki so daleč zunaj pričakovanega razpona ali porazdelitve zbranih podatkov. Osamelci so lahko pokazatelji nepravilno zbranih ali nepravilno označenih podatkov in jih je zato treba obravnavati pred analizo podatkov. Ugotovljeno je bilo, da se z izločitvijo osamelcev izboljšanja zanesljivost fenoloških podatkov v obliki časovnih vrst (Linkosalo in sod. 1996). Na splošno lahko na preprost način izločimo osamelce iz podatkov na podlagi grafične diagnostike s ponazoritvijo podatkov z okvirjem z ročaji. Vsaka vrednost, ki je manjša ali večja od 1,5-kratnika kvartilnega razmika vzorčenih vrednosti, se šteje za osamelec, grafično prikazan s točko zunaj okvirja z ročaji. Pri normalno porazdeljenih podatkih je mogoče uporabiti tudi pristop z z-vrednostjo. Pri tem pristopu se osnovne vrednosti pretvorijo v z-vrednosti:

$$z_i = \frac{x_i - \bar{x}}{s}$$

pri čemer je z_i = normalizirana z-vrednost, x_i = osnovna vrednost, \bar{x} = povprečna vrednost vzorca, s = standardni odklon vzorca. Podatki se štejejo za osamelce, če je z-vrednost večja od danega praga, npr. več kot tri standardne odklone od povprečja, kot so izpeljali Gerard in sod. (2020). King (1953) je predstavil test neskladnosti s podobnim pristopom, ki ga je prav tako mogoče uporabiti pri normalno porazdeljenih podatkih in pri katerem se izračuna vrednost testne statistike T_i s primerjavo presežka skrajne vrednosti od najbližje vrednosti v skupnem razponu in vrednosti, za katero ta vrednost T_i presega kritično vrednost (podrobno pojasnjeno v Barnett in Lewis 1978). Ta test so uporabili Linkosalo in sod. (1996). Napake v mesecih (napaka v protokolu, pri katerem je bil mesec meritve napačno zapisan) je mogoče prav tako zanesljivo odkriti na podlagi pravila 30-dnevnega ostanka (metoda brez porazdelitve) zaradi velikega odklona takih vrednosti (Schaber in Badeck 2002). Uporaba enega ali kombinacije opisanih pristopov bi moralo zadostovati za odkritje in popravek ali izločitev osamelcev.

Strokovno znanje raziskovalca je prav tako pomemben dejavnik pri filtriranju nerealnih osamelcev (ki pa so lahko še vedno v okviru dane porazdelitve in se zato pri odkrivanju osamelcev ne izločijo), kot so nenormalno velike vrednosti premera drevesa za dano vrsto. Glede na to, da fenologija opisuje pojave naravnega in zaporednega razvoja (npr. olistanje nastopi pred cvetenjem, to pa nastopi pred senescenco listov), je treba preveriti tudi smiselnost podatkov, da se zagotovi, da meritve teh spremenljivk dejansko potekajo v logičnem zaporedju.

6.5.3.2 Analiza terenskih podatkov

6.5.3.2.1 Verifikatorji

Pri gozdnem genetskem monitoringu se verifikatorji kazalnika selekcija merijo ob različnih časovnih točkah skozi vse leto v obdobju več let. Za večino verifikatorjev je mogoče na ravni populacije izračunati povprečja za različna obdobja. Na splošno je mogoče verifikatorje primerjati med leti in populacijami z različnimi parametričnimi in neparametričnimi statističnimi pristopi glede na vrsto odvisne spremenljivke. Pri verifikatorjih, ki so številске spremenljivke, se povprečja na ravni populacije med leti primerja z uporabo modelov linearne regresije ali linearnih

mešanih modelov (pri katerih je mogoče opredeliti moteči dejavnik, ki je pomemben, kadar so opazovanja/meritve izvedeni na istem objektu). Pri verifikatorjih, pri katerih se ocena izvede z uporabo šifranta, je mogoče uporabiti ordinalno regresijo (npr. model `clmm` v R, pri katerem je mogoče opredeliti moteče dejavnike) ali Kruskal-Wallisov test. Števni podatki običajno sledijo Poissonovi porazdelitvi. Zato je mogoče pri verifikatorjih, ki so števni podatki, za analizo uporabiti Poissonovo regresijo (posplošeni linearni modeli ali posplošeni mešani modeli z družino Poissonove porazdelitve).

6.5.3.2.1.1 Mortalitet/preživetje

Ozadje

Mortaliteta/preživetje se preprosto nanaša na število odmrlih dreves glede na izhodiščno število (in prejšnjo oceno). Sprememba mortalitete ali preživetja (mortaliteta = 1 – preživetje) kaže na delovanje selekcijskega pritiska, tj. odmiranje, kadar je vrednost mortalitete povečana. Zato je to pomemben kazalnik potencialnih selekcijskih pritiskov na populacijo, ki vodijo v odmrtnje, saj je šlo verjetno pri preživelih drevesih za neke vrste adaptivni odziv na tak pritisk.

Izračun

Mortaliteta je izražena kot stopnja mortalitete, izračunana z naslednjo enačbo:

$$m = 1 - \left(\frac{N_1}{N_0}\right)^{1/t}$$

pri čemer sta N_0 in N_1 število dreves na začetku in število dreves ob koncu popisnega intervala, t pa dolžina popisnega intervala v letih. Stopnja mortalitete, izračunana po tej enačbi, je letna stopnja mortalitete in je konstantna, kar pomeni, da se interpretira kot povprečna letna stopnja mortalitete za navedeno desetletje. Če izpustimo eksponent, dobimo 10-letno stopnjo mortalitete.

Če bi bilo treba zaradi gospodarjenja z gozdom nadomestiti prvotna drevesa, je mogoče mortaliteto izraziti tudi kot absolutno število odmrlih dreves na 50 dreves v 10-letnem obdobju, ki se izračuna tako, da se število preostalih živih dreves odšteje od začetnega števila označenih dreves:

$$\text{Mortaliteta} = N_0 - N_1$$

pri čemer je N_0 začetno število dreves in N_1 število preostalih živih dreves. Če se katero koli od prvotnih 50 dreves poseka v okviru gospodarjenja, je treba nadomestno drevo vključiti v začetno število dreves in v število preostalih dreves. Drevesa, ki so bila posekana v okviru gospodarjenja, se ne štejejo za odmrta drevesa. Začetno število dreves vsakega desetletnega intervala je 50 (glej poglavje 3.4.2 Nadomeščanje dreves).

Razlika v mortaliteti med popisi je opisana z uporabo verižnega indeksa in stopnje rasti, pri čemer se vrednost mortalitete v popisu c vedno primerja z mortaliteto v popisu $c - 1$.

6.5.3.2.1.2 Obilnost mladja

Ozadje

Pri vzdrževanju gozdnega sestojka k mortaliteti prispevajo številni naravni dejavniki, vključno s staranjem, objedanjem in boleznimi, in potencialno redčenje v okviru človeške dejavnosti, kot je izkoriščanje naravnih virov. Zato je za to, da gozdni sestoj ostane trajnosten, nujno, da se nenehno pomlajuje. To je mogoče doseči z umetno obnovo, naravno obnovo drevesnega sestojka ali kombinacijo obojega. Pri umetni obnovi se drevesa vzgojijo zunaj gozda, tj. v drevesnicah, in se presadijo v gozd, ko dosežejo ustrezno starost. Pri naravni obnovi se gozd nasprotno obnavlja z drevesi, ki se razvijejo iz semen, ki padejo z dreves in vzklijejo *in situ*. Obilnost dreves, ki zrastejo v okviru naravne obnove, zato kaže na delovanje selekcijskih pritiskov, ki vplivajo na uspešnost

reprodukcije, stopnjo preživetja mladja ter stopnjo mortalitete odraslih dreves (ki vpliva na zalogo, iz katere se lahko gozdovi obnavljajo). Obilnost mladja je opredeljena kot število mladja na enoto površine.

Izračun

Na osnovni ravni se obilnost naravnega mladja oceni na podlagi strokovnega mnenja, ali je količina naravnega mladja na ploskvi za gozdni genetski monitoring zadostna. Na standardni in napredni ravni se določi s štetjem vseh rastlin na dvajsetih ploskvah s površino 1 m² po različnem obrodu, kot je navedeno v smernicah za posamezno vrsto. Kot pri mortaliteti gre za oceno na ravni populacije, ki jo je mogoče kvalitativno primerjati med obdobji/starostnimi skupinami.

Na osnovni ravni se sprememba obilnosti naravnega mladja skozi leta opiše na podlagi strokovnega mnenja. Na standardni ravni se obilnost naravnega mladja v letu t v prvem naboru podploskev naravnega mladja primerja z obilnostjo naravnega mladja v letu $t + 6$ v drugem naboru podploskev naravnega mladja, če je naslednji obrod ocenjen po 6 letih. Na obeh naborih podploskev naravnega mladja se mladje ponovno prešteje po 5 letih (v letu $t + 5$ za prvi nabor podploskev naravnega mladja in v letu $t + 11$ za drugi nabor podploskev naravnega mladja). Enako se primerja obilnost mladja starosti pet let na obeh naborih podploskev naravnega mladja. Za analizo je primeren model, pri katerem se upošteva diskretnost številske spremenljivke, na primer Poissonova regresija. Na napredni ravni se mladje iz posameznega nabora podploskev naravnega mladja, v primerjavi s standardno ravno, dodatno prešteje tudi po 10 in 15 letih. Analiza se izvede na enak način kot na standardni ravni, in sicer s primerjavo obilnosti naravnega mladja iste starosti.

6.5.3.2.1.3 Cvetenje

Ozadje

Fenologija cvetenja je proučevanje časa razvoja moških in ženskih cvetov s popisom različnih fenoloških faz (Ducci in sod. 2012). Fenologija cvetenja je ključni dejavnik, ki vpliva na reproduktivno sposobnost dreves z izmenjavo genov med genotipi, ta izmenjava pa določa genetsko variabilnost proizvedenega semena in uspešnost preživetja mladja, ki iz tega semena vzkljuje (Alizoti in sod. 2010).

Izračun

Pri fenoloških opazovanjih se upoštevajo ocena obilnosti cvetenja/delež cvetočih dreves na ravni sestoja (osnovna raven gozdnega genetskega monitoringa) in na ravni posameznega drevesa (standardna raven gozdnega genetskega monitoringa) ter razvojne faze (fenološke faze) moških in ženskih cvetov od spečih cvetnih brstov do polno razvitih cvetov/storžkov/strobilov (napredna raven gozdnega genetskega monitoringa). Podatki se uporabljajo za oceno jakosti cvetenja in delež cvetočih dreves (osnovni, standardni in napredni gozdni genetski monitoring). Dodatni podatki (napredni gozdni genetski monitoring) se uporabljajo za pripravo fenogramov, ki prikazujejo začetek, trajanje, konec in sinhronizacijo pojava ter različne fenološke faze. Ti podatki se analizirajo z uporabo parametričnih in neparametričnih statističnih metod za oceno pomembnosti fenoloških razlik med posameznimi drevesi znotraj populacije ali populacij. Za oceno podatkov o fenologiji cvetenja se lahko uporablja vsa ustrezna programska oprema, ki izvaja parametrično in neparametrično statistično analizo (tj. SPSS, R).

6.5.3.2.1.4 Obrod

Ozadje

Jakost in periodičnost obroda med zaporednimi semenskimi leti sta značilni za posamezno vrsto in se spreminjata glede na vremenske razmere, razpoložljivost virov in genetski nadzor (Mund in sod. 2010 ter tam navedena literatura in viri). Začetek obroda je pomemben znak, ki kaže na dozorevanje dreves in na to, da je del virov, ki so bili prej namenjeni vegetativni rasti in obrambi, od takrat na voljo tudi za reprodukcijo (Seifert in Müller-Starck 2009).

Izračun

Pri fenoloških opazovanjih se upoštevata periodičnost in jakost obroda. Podatki se zbirajo na ravni sestoja (osnova raven gozdnega genetskega monitoringa) in na ravni posameznega drevesa (standardna in napredna raven gozdnega genetskega monitoringa) ter se analizirajo z uporabo parametričnih in neparametričnih statističnih metod za oceno pomembnosti fenoloških razlik med posameznimi drevesi znotraj populacije ali populacij. Za oceno podatkov o obrodu se lahko uporablja vsa ustrezna programska oprema, ki izvaja parametrično in neparametrično statistično analizo (tj. SPSS, R).

6.5.3.2.2 Dodatne informacije

6.5.3.2.2.1 Odmiranje krošnje (samo *Fraxinus excelsior*)

Ozadje

Odmiranje krošnje so dodatne informacije, ki se uporabljajo samo pri gozdnem genetskem monitoringu velikega jesena (*Fraxinus excelsior* L.). Povzročitelj odmiranja krošnje pri velikem jesenu je glivni patogen *Hymenoscyphus fraxineus*. Simptomi bolezni so se prvič pojavili v evropskih populacijah vrste *F. excelsior* na začetku 90. let in so privedli do epidemije, ki še traja. Za bolezen so značilne nekrotične spremembe na listih, vejicah in deblih okuženih gostiteljev, ki vodijo v venenje in odmiranje krošnje (zadnje raziskave je povzel Gross in sod. 2013). Resnost odmiranja krošnje je tesno povezana z genetskim potencialom osebka ali populacije za odpornost proti glivnemu patogenu, ki povzroča bolezen. Opredeljeni so bili genetski markerji, ki kažejo, da je odpornost proti odmiranju jesena poligena lastnost, ki se lahko dobro odziva na naravno selekcijo in programe gojenja (Harper in sod. 2016, Stocks in sod. 2019). Zato odmiranje krošnje verjetno predstavlja zelo močan selekcijski pritisk na populacije velikega jesena. Odmiranje jesena je mogoče učinkovito spremljati z vizualnimi pregledi obolelih in zdravih dreves na terenu in z molekularnim testiranjem na genetske markerje, ki lahko pomenijo večjo odpornost (Menkis in sod. 2019).

Izračun

Dokaze selekcije za odpornost proti odmiranju jesena bi bilo mogoče primerjati med skupinami iste starosti med različnimi ocenami (v času) in med populacijami na podlagi monitoringa stopenj mortalitete zaradi odmiranja in stopnje poškodovanosti krošnje in širjenja okužbe pri nezdravih drevesih iz posamezne skupine in populacije skozi čas.

Za analizo je mogoče izračunati odstotke jesenov v različnih razredih odmiranja krošnje. Za analizo pomembnih razlik pri odmiranju krošnje med različnimi obdobji za povprečja posameznega razreda odmiranja krošnje je mogoče uporabiti metodo ANOVA s post-hoc testom.

Za analizo je mogoče uporabiti programsko opremo, kot je SPSS, ali programske jezike, kot sta R ali Python.

6.5.3.2.2.2 Razmerje med spoloma (samo dvodomne vrste)

Ozadje

Razmerje med spoloma se nanaša na popis spola posameznega drevesa pri dvodomnih vrstah. Razmerje med spoloma je na splošno v ravnovesju, kot se pričakuje v skladu s Fisherjevim zakonom (Fisher 1930), ali se rahlo nagiba v prid moškemu spolu (Lloyd 1974, Barrett in sod. 2010). Ekološko genetiko razmerja med spoloma so proučevali Barret in sod. 2010. Predpostavljajo, da naj bi se razmerje med spoloma nagibalo v prid moškemu spolu predvsem zaradi neenakega vložka posameznega spola v reprodukcijo, vključno z zgodnejšim nastopom cvetenja pri moških osebkih, pogostejšim cvetenjem pri moških osebkih in večjo mortaliteto pri ženskih osebkih. Vendar se ta učinek lahko zmanjša, ko se skupina stara in ko ženska drevesa postanejo reprodukcijsko dejavnejša. Monitoring razmerja med spoloma v populacijah dvodomnih drevesnih vrst je pomemben zaradi učinka na efektivno velikost populacije, saj je efektivna velikost populacij s porušenim

razmerjem med spoloma običajno manjša (Wright 1938). Manjša efektivna velikost populacije lahko posledično zaradi manjše efektivne velikosti razpoložljivega genskega sklada povzroči manj učinkovito naravno selekcijo v populaciji, to pa vodi v večjo stopnjo genetskega zdrsa in opraševanja med sorodniki ter posledično v izgubo genetske variabilnosti (Charlesworth 2009). Spremembe razmerja med spoloma med različnimi generacijami, so lahko zato znak genetske zmožnosti kohorte, da se odzove na naravno selekcijo, ter njihove dolgoročne viabilnosti in trajnosti.

Izračun

Pri primerjavi ugotovljenega števila osebkov posameznega spola in pričakovanega števila, tako rekoč teoretično pričakovanega razmerja med spoloma, ali razmerij v različnih obdobjih lahko uporabimo hi-kvadrat test ali G-test.

Za naprednejšo analizo je mogoče uporabiti log-linearno analizo, in sicer če želimo vključiti več podatkov, da bi preverili možne korelacije med razmerjem med spoloma v populaciji in drugimi značilnostmi življenjske zgodovine.

Če so na voljo podatki z drugih lokacij (ploskev), je mogoče za kvantificiranje časovne in prostorske variabilnosti pri razmerju med spoloma uporabiti Gaussov posplošeni linearni mešani model, pri čemer se razmerje med spoloma modelira kot funkcija leta, koordinat x in y geografskega koordinatnega sistema in njihove interakcije. Lokacija in leto bi se morala vključiti kot slučajna učinkina, da se upošteva neodvisnost števil z istega mesta in iz istega leta.

Za analizo je mogoče uporabiti programsko opremo, kot je SPSS, ali programske jezike, kot je R ali Python.

6.5.3.2.2.3 Porazdelitev debelinskih in višinskih razredov

Ozadje

Višina dreves in prsni premer sta meri velikosti drevesa, ki sta lahko značilni za starost drevesa. Poleg tega je bilo ugotovljeno, da velikost rastlin vpliva na fenologijo cvetenja, čeprav je mogoče ta učinek najbolj očitno opaziti pri drevesih, ki cvetijo vsako leto (Otárola in sod. 2013). Velikost drevesa lahko poslabša fenologijo cvetenja, ker vpliva na razpoložljivost svetlobe in pridobivanje virov (Muller-Landau in sod. 2006), s tem pa prispeva k sposobnosti reprodukcije in prenosu genov na naslednjo generacijo. Porazdelitvene krivulje premera in višine dreves na ploskvi kažejo na sedanje in pretekle selekcijske pritiske, ki vplivajo na sukcesijske trende drevesnih krošenj (Buchholz in Pickering 1978).

Izračun

Za razumevanje variabilnosti porazdelitve debelinskih in višinskih razredov med različnimi obdobji je mogoče podatke najprej grafično prikazati in za prikaz porazdelitev uporabiti eksponentno funkcijo po nelinearni metodi najmanjših kvadratov (z uporabo funkcije `nls` v paketu R »stats« (R Core Team 2020)). Za kvantitativno primerjavo teh porazdelitev je mogoče uporabiti Anderson-Darlingov test za k vzorcev (kot alternativa Kolmogorov-Smirnovemu testu). V ta namen uporabimo funkcijo `adKSampleTest` ali `adAllPairsTest` v paketu R »PMCMRplus«, da naredimo primerjavo vseh parov (Pohlert 2020).

Ker je velikost drevesa v korelaciji z različnimi verifikatorji in okoljskimi parametri, je mogoče izvesti druge analize, pri katerih se te korelacije upoštevajo. Izvesti je mogoče linearno regresijo, da se na primer preveri, ali so ostanki prsnega premera in višine v korelaciji z, na primer, temperaturo ali padavinami. Taka analiza lahko pomaga razumeti, ali povišana temperatura negativno vpliva na prsni premer in višino.

6.5.3.2.2.4 Olistanje

Ozadje

Olistanje je obdobje od dormantnih brstov do dolžinske rasti poganjkov. Informacije o času in trajanju olistanja so pomembne za razumevanje dejanskega stanja posameznih dreves in populacij gozdnih dreves v spreminjajočem

se okolju. Pomembno je odkrivati trende in morebitne dejavnike (naravne in/ali antropogene), ki spreminjajo čas in trajanje fenoloških faz (čas začetka, trajanje obdobja in razsežnost) (Beuker in sod. 2010).

Izračun

Pri fenoloških opazovanjih se upošteva faza in delež krošnje z razvijajočimi se listi. Med olistanjem se opazuje 50 dreves enkrat na teden. Podatki se uporabijo za izdelavo fenogramov, ki prikazujejo začetek, trajanje in konec pojavov na ravni posameznega drevesa, ter se analizirajo z uporabo parametričnih in neparametričnih statističnih metod za oceno pomembnosti fenoloških razlik med posameznimi drevesi znotraj populacije ali populacij. Za oceno podatkov o fenologiji olistanja se lahko uporablja katera koli ustrezna programska oprema, ki izvaja parametrične in neparametrične statistične analize (tj. SPSS, R).

6.5.3.2.2.5 Usklajenost cvetenja

Ozadje

Usklajenost cvetenja je del fenologije cvetenja, ki se osredotoča na čas razvoja moškega in ženskega cveta s popisom različnih fenoloških faz (Ducci in sod. 2012). Usklajenost cvetenja spremljamo samo na napredni ravni na podlagi podatkov, zbranih za verifikator »cvetenje«. S to informacijo ugotavljamo, ali sta moško in žensko cvetenje v spremljanem sestoju časovno usklajeni.

Izračun

Pri fenoloških opazovanjih se upoštevajo faze razvoja (fenološke faze) moških in ženskih cvetov od spečih cvetnih brstov do polno razvitih cvetov/storžkov/strobilov. Podatki se uporabijo za izdelavo fenogramov, ki prikazujejo začetek, trajanje in konec ter sinhronizacijo pojava in različne fenološke faze na ravni posameznega drevesa, ter se analizirajo z uporabo parametričnih in neparametričnih statističnih metod za oceno pomembnosti fenoloških razlik med posameznimi drevesi znotraj populacije ali populacij. Za oceno usklajenosti cvetenja se lahko uporablja katera koli ustrezna programska oprema, ki izvaja parametrične in neparametrične statistične analize (tj. SPSS, R).

Usklajenost cvetenja se oceni z uporabo Askewevega indeksa (PO_o) – indeksa prekrivanja fenoloških faz (Askew in Blush 1990):

$$PO_o = \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^t \frac{PO_{jk}}{(t(t-1))}$$

Skupni indeks prekrivanja fenoloških faz za vse kombinacije opravevanja med nesorodnimi osebki med vsemi opazovanimi drevesi; $j \neq k$

$$PO_{jk} = \frac{\sum_{i=1}^n (s_{ijk} - \Delta_{ijk})}{\sum_{i=1}^n s_{ijk}}$$

Indeks prekrivanja fenoloških faz za drevo j in drevo k pri n opazovanjih i ; $j \neq k$

$$\Delta_{ijk} = |m_{ik} - p_{ij}|$$

Absolutna vrednost razlike med m_{ik} in p_{ij} ; $j \neq k$

Pri čemer je:

p_{ij} = delež opazovanih moških cvetov osebka j , ki trosijo pelod na dan i ; m_{ik} = delež opazovanih ženskih cvetov osebka k , ki so receptivni na dan i ; s_{ijk} = večja od vrednosti p_{ij} in m_{ik} .

6.5.3.2.2.6 Senescenca

Ozadje

Senescenca listov je skupno zaporedje degenerativnih dogodkov, ki zmanjšajo metabolne aktivnosti ter povzročijo odmrtnje celic, tkiv in listov kot organa (Lim in sod. 2007). Informacije o času in trajanju senescence listov so zato pomembne za razumevanje dejanskega stanja posameznih dreves in populacij gozdnih dreves v spreminjajočem se okolju.

Izračun

Pri fenoloških opazovanjih se upošteva sistem točkovanja, ki se uporablja za oceno senescence listov, faze in deleža prizadete krošnje. Podatki se uporabijo za izdelavo fenogramov, ki prikazujejo začetek, trajanje in konec pojavov na ravni posameznega drevesa, ter se analizirajo z uporabo parametričnih in neparametričnih statističnih metod za oceno pomembnosti fenoloških razlik med posameznimi drevesi znotraj populacije ali populacij. Za oceno podatkov o senescenci se lahko uporablja katera koli ustrezna programska oprema, ki izvaja parametrične in neparametrične statistične analize (tj. SPSS, R).

6.5.4 Analiza molekularnih podatkov

6.5.4.1 Preverjanje celovitosti molekularnih podatkov

Tradicionalno raziskovalci genotipizirajo vzorce z uporabo nabora hipervariabilnih mikrosatelitnih lokusov (SSR), da bi pridobili zadostno statistično moč za nadaljnje analize. Vendar imajo običajno ti lokusi višjo stopnjo napake (Flores-Rentería in Krohn 2013), kar lahko posledično privede do manjše razločevalne moči in pristranskega sklepanja (Dąbrowski in sod. 2015).

Ena od najpogostejših težav pri genotipiziranju z mikrosateliti je prisotnost zdrsnih artefaktov. Ti se pojavijo kot rezultat zdrsa polimeraze in lahko povzročijo visoke stopnje napak, zlasti v primeru heterozigotov s sosednjimi aleli (Clarke in sod. 2001). V fazah načrtovanja projekta bi bilo treba dati prednost markerjem s trinukleotidnimi ponovitvami pred dinukleotidnimi mikrosateliti, saj je pri prvih pogostost tega pojava na splošno manjša (Flores-Rentería in Krohn 2013). Poleg tega so bili za zmanjšanje zdrsa predlagani začetni oligonukleotidi, ki vključujejo del mikrosatelitnega zaporedja (Flores-Rentería in Whipple 2011). Najstajanje zdrsnih artefaktov lahko zmanjšamo z optimiziranjem pogojev in programa PCR (za podrobnosti glej 6.4.2.2). Nazadnje so lahko tudi po optimizaciji v laboratoriju prisotni zdrsni artefakti in bo morda potreben ponovni pregled ali analiza težavnih vzorcev (Dewoody, Nason in Hipkins 2006). Za odkrivanje lokusov, ki so morda napačno določeni zaradi nastajanja zdrsnih artefaktov, z ugotavljanjem primanjkljaja heterozigotov s sosednjimi aleli je mogoče uporabiti programsko opremo Micro-Checker (Van Oosterhout in sod. 2004).

Izpad alelov ali dominanca kratkih alelov opisuje stohastično možnost, da se največji alel v heterozigotnem vzorcu ne s PCR ne pomnoži. Ugotovljeno je bilo, da so možni vzroki za to: (i) slaba kakovost in majhna količina matrične DNK (Taberlet in sod. 1996) ter (ii) tekmovalni značaj PCR (tj. krajši aleli se pomnožujejo uspešneje kot daljši) (Gagneux in sod. 1997). Ker ta težava ni sistematična bi moral korak čiščenja DNK in/ali drugo pomnoževanje s PCR povečati možnosti odkritja izpadlih alelov (Flores-Rentería in Krohn 2013). Znak izpada alela na lokusu je prisotnost velikega števila homozigotov na skrajnih koncih alelnega razpona, ki jih je mogoče ugotoviti s programsko opremo Micro-Checker (Van Oosterhout in sod. 2004).

Če se aleli sistematično ne amplificirajo zaradi mutacij na mestih prileganja začetnih oligonukleotidov, take alele imenujemo ničelni aleli (Oddou-Muratorio in sod. 2009). Poleg običajnih težav, povezanih z napakami pri genotipizaciji, kot je pristranskost v statistiki genetske raznolikosti/diferenciacije, je glavni učinek ničelnih alelov izključitev pravih staršev v analizah starševstva (Dakin in Avise 2004). Na voljo je več računalniških programov, s katerimi lahko raziskovalci izračunajo prisotnost in frekvenco ničelnih alelov, na primer genepop (Rousset 2008), ML-NullFreq (Kalinowski in Taper 2006), Micro-Checker (Van Oosterhout in sod. 2004) in Cervus (Summers in Amos 1997). Vendar obstajajo neskladnosti pri oceni števila in/ali frekvence ničelnih alelov med različno programsko opremo, zaradi česar je sklepanje oteženo. Zato se priporočata uporaba več metod in uporaba median (Dąbrowski in sod. 2015). Nunziata in sod. (2015) so izključili lokuse z ničelnimi aleli, če so bile vrednosti F_{ST} med različnimi vzorčevalnimi mesti nižje, kot če so bili lokusi z ničelnimi aleli vključeni.

Stohastične napake pri genotipizaciji so lahko tudi posledica človeške napake v postopku določanja alelov. Iz seznama privatnih alelov, kot ga sestavi program GenAIEx (Peakall in Smouse 2006) ali poppr (Kamvar in sod. 2014), lahko identificiramo potencialno lažne alele, ki jih je treba dodatno raziskati. Posebno pozornost je treba nameniti alelom, pri katerih se ne ponovi osnovni motiv markerja. Vendar samo ta značilnost ni nujno razlog za

njihovo odstranitev, saj je lahko določanje alelov zunaj motiva ponovitve zavestna izbira za pravilno evidentiranje vse raznolikosti, zlasti v primeru sestavljenih mikrosatelitov (npr. (GT)₆(ACA)₉) (Flores-Rentería in Krohn 2013). Pri odkritju alelov, o katerih prej ni bilo poročil v literaturi in/ali ki ležijo zunaj alelnega razpona glede na znane podatke, je prav tako treba ravnati previdno. Če se tak alel pojavi večkrat v naboru podatkov, ni razloga, da bi izpodbijali njegov obstoj. Če pa ta alel najdemo v enem samem vzorcu, priporočamo ponovitev reakcije PCR (Flores-Rentería in Krohn 2013).

Pri odkrivanju napak pri določanju alelov se lahko izkaže za koristno tudi analiza glavnih komponent (PCA). Vzorce, za katere se zdi, da so daleč od svoje populacije, je treba pregledati ročno. Poleg tega je mogoče s PCA identificirati alele, ki so možni artefakti in za katere se zdi, da imajo velik vpliv na diferenciacijo vzorca. To je mogoče preprosto preveriti z grafičnim prikazom nalaganja alelov, ki tvorijo glavno komponento, v paketu R *adegenet* (Jombart 2008) s funkcijo *loadingplot*.

Nazadnje, v primeru multiple PCR, kadar je koncentracija produktov PCR nekajkrat višja od priporočenega razpona, lahko pride do spektralnega prekrivanja med različnimi fluorofori (Flores-Rentería in Krohn 2013). V takem primeru so na elektroferogramu prisotni lažni vrhovi, ki izvirajo iz pravih alelov označenih z drugim fluoroforom; pojav je v literaturi znan kot »bleedthrough« ali »pull-up«. Določanje teh lažnih vrhov za prave alele bi pomenilo, da bi bil isti alel določen dvakrat, kot alela enakih dolžin, ki pa izvirata iz dveh različnih lokusov, s čimer bi se povezala dva alela z različnih lokusov. Pričakuje se, da zato nastane signal, zaznan kot lažno vezavno neravnovesje (LD) med lokusi. Zato bi bilo treba višje vrednosti vezavnega neravnovesja dodatno raziskati med markerji s prekrivajočimi se pomnožki PCR.

V fazi načrtovanja projekta bi morali raziskovalci na splošno poskušati iz objavljene literature pridobiti čim več informacij o ponovljivosti analize markerjev med laboratoriji ter prisotnosti neželenih interakcij med lokusi (tj. resnično vezavno neravnovesje). Poleg tega se priporoča, da se reprezentativni vzorec nabora podatkov (npr. 10 %) ponovno analizira zaradi nadzora kakovosti (Dewoody in sod. 2006). Po primerjavi podatkov je treba ponazoriti stopnjo napake za vsak lokus in za vse lokuse kot:

- stopnjo napake na reakcijo: delež reakcij PCR z najmanj enim nepravilnim alelom od skupnega števila reakcij ter
- stopnjo napake na alel: delež nepravilnih alelov od skupnega števila alelov (Hoffman in Amos 2005).

6.5.4.2 Filtriranje molekularnih podatkov

Filtriranje podatkov je pomemben korak za pridobivanje zanesljivih rezultatov iz neobdelanih podatkov. Filtri so bistveni za omilitev učinkov manjkajočih vrednosti in razločitev učinkov različnih evolucijskih procesov.

Pri filtriranju podatkov je prvi korak odstranitev lokusov z velikim deležem manjkajočih vrednosti (mejno vrednost je treba opredeliti pred začetkom analize). Drugi korak vključuje posamezne vzorce, ki presegajo vnaprej opredeljeno raven manjkajočih vrednosti, ki jih je prav tako treba odstraniti iz nadaljnjih analiz.

Določitev splošne mejne vrednosti za manjkajoče vrednosti za lokuse (npr. 10 %) vključuje pričakovanje, da so manjkajoči podatki relativno enakomerno porazdeljeni med kohorte in vzorce. Ta predpostavka pa ne more biti izpolnjena, če se skupaj analizirajo vzorci iz populacij, ki so med seboj geografsko izolirane ali vzorci iz različnih filogenetskih linij (npr. *A. alba* in *A. borisii-regis*). V takih primerih je velika verjetnost, da bodo ugotovitve pristranske (»ascertainment bias«). Taka pristranskost je pričakovana zaradi velike genetske oddaljenosti med osebki, ki so bili uporabljeni pri odkrivanju lokusov in zasnovi začetnih oligonukleotidov, na eni strani in genotipiziranimi vzorci na drugi strani. Znano je, da so mreže SNP posebno nagnjene k tej vrsti pristranskosti (Albrechtsen in sod. 2010). V naboru podatkov LIFEGENMON so imele grške populacije (*A. borisii-regis* in *Fagus sylvatica*) glede na podatke SNP nižje vrednosti genetske raznolikosti v primerjavi s srednjeevropskimi populacijami, v naboru podatkov SSR pa podobne vrednosti. Te neskladnosti so lahko posledica pristranskosti ugotovitev, zato je morda za take primere filtriranje bolje izvesti na ravni posameznih skupin.

Kot tretji korak je mogoče uporabiti tudi filter na podlagi frekvence redkega alela (MAF, iz angl.: »Minor allele frequency«). Namen takega filtriranja je odstranitev neinformativnih markerjev in potencialnih napak pri genotipiziranju, ki lahko ovirajo sklepanje (Roesti in sod. 2012). Za SSR se običajno uporabi pet- ali enoodstotni filter na podlagi MAF, saj so taki markerji relativno neinformativni. Vendar bo morda koristno spremljati časovne spremembe alelnih frekvenc teh lokusov, zlasti če so povezane z izraženimi zaporedji (EST-SSR), saj lahko taki lokusi potencialno omogočijo vpogled v adaptivno genetsko raznolikost. Za genotipiziranje SNP prek platforme KASP nizka stopnja napak te tehnike v primerjavi z genotipiziranjem s tehnologijami sekvenciranja naslednje generacije (Semagn in sod. 2014) pomeni, da je izključitev lokusov s polimorfizmi z nizkimi frekvencami iz vseh nadaljnjih analiz verjetno pretirana. To zlasti velja za manjše nabore podatkov, pri katerih lahko povzroči izločitev privatnih alelov in oslabi signal pretoka genov. Zato se predlaga, da se odstranijo samo markerji, pri katerih se redki alel v naboru podatkov pojavi samo do dvakrat (Pluess in sod. 2016), ali da se filter na podlagi MAF uporabi zlasti za analize, pri katerih je to potrebno (npr. ocena učinkovite velikosti populacije, F_{ST} testi osamelcev itd.) v skladu z zadevnim priročnikom za uporabo programske opreme.

Vezavno neravnovesje (LD) vključuje dodatni dejavnik pri analizi nabora podatkov molekularnih markerjev. Vezavno neravnovesje med pari lokusov bi lahko pomenilo fizično bližino teh lokusov v genomu, lahko pa bi se pojavilo tudi med nepovezanimi lokusi kot posledica zdrsa. Posledica neodstranitve povezanih markerjev so napačne ocene spremenljivk, ki so odvisne od tega signala, kot je ocena učinkovite velikosti populacije (N_e) z metodo LD (Hill 1981). Za izračun LD je na voljo več paketov programske opreme, kot sta Arlequin (Excoffier in Lischer 2010) in paket R poppr (Kamvar in sod. 2014). Ker gre za postopek, pri katerem se testira več hipotez, je možnost nepravilno zaznanega vezavnega neravnovesja med parom lokusov velika. Zato je ključno, da se izvedejo popravki za večkratne teste. Pri podatkih SSR se to običajno doseže z uporabo Bonferronijevega zaporednega popravka (Rice 1989). Pri naborih podatkov SNP bi bil lahko ta popravek preveč konzervativen, zato se namesto njega uporablja stopnja lažnih odkritij (FDR, iz angl.: »false discovery rate«) (Benjamini in Hochberg 1995). Za navedene izračune je na voljo paket multcomp (Hothorn in sod. 2008) v R.

Izračun zbirnih statističnih podatkov iz nabora podatkov, ki morda vsebuje lokuse, na katerih poteka selekcija, bi lahko oviral signal demografskih procesov. Zato se pri raziskovanju demografije svetuje odstranitev lokusov, pri katerih gre zanesljivo dokazano za adaptivne polimorfizme. Ti lokusi imajo vrednosti F_{ST} osamelcev in se zanje pričakuje, da jih bo mogoče odkriti z eno ali po možnosti več metodami za odkrivanje osamelcev F_{ST} (za več podrobnosti glej F test osamelcev).

Prisotnost ničelnih alelov lahko vpliva na izračun zbirnih statističnih podatkov iz nabora podatkov, ki morda vsebuje višji odstotek teh alelov. Prisotnost ničelnih alelov je mogoče preveriti z uporabo različne programske opreme (npr. Micro-checker (Van Oosterhout in sod. 2004), CERVUS (Kalinowski in sod. 2007) in paket R PopGeneReport (Adamack in Gruber 2014)). Če je prisotnih zelo veliko ničelnih alelov, se svetuje odstranitev zadevnih lokusov iz nadaljnje analize (Chapuis in sod. 2008, Belletti in sod. 2012).

6.5.4.2.1 Filtriranje podatkov SNP

Pri naborih podatkov LIFEENMON so se manjkajoči podatki obravnavali v skladu z obravnavo v podobnih študijah, opisanih v literaturi (Csilléry in sod. 2020; Heer in sod. 2018).

6.5.4.3 Analiza molekularnih podatkov

6.5.4.3.1 Verifikatorji

6.5.4.3.1.1 Alelna frekvenca (»Allele frequency«)

Ozadje

Lokusi in aleli so osnovne enote, ki se merijo v populacijski genetiki. Locus je ločena genetska enota, ki jo obravnavamo, na primer celoten gen, bazni par enega nukleotida (A-T in C-G) ali niz nukleotidov. Za vsak genetski locus je lahko več različic, ki so znane kot aleli. Polimorfizmi enega nukleotida (SNP) so zamenjave enega nukleotida na določenem mestu v genomu. V diploidnem organizmu lahko zato locus SNP vsebuje dve kopiji istega alela – je monomorfen – ali dva različna alela – je polimorfen. Ponovitve enostavnih zaporedij (ang. simple sequence repeats – SSR, znane tudi kot mikrosateliti) so nabori ponovljenih zaporedij DNK na lokusu kromosoma. Zato lahko vsebujejo več zamenjav in več kot dva alela.

Zaradi variacij alelov med lokusi se osebkki in populacije med seboj genetsko ločijo, te variacije pa so temelj vseh nadaljnjih ukrepov v populacijski genetiki. Alelna frekvenca je preprosto relativna frekvenca kromosomov pri vseh osebkkih v populaciji, ki imajo določen alel. Izračuna se iz frekvence opaženih genotipov v populaciji.

Izračun

Pri SNP v diploidni populaciji z aleloma B in b so genotipske frekvence prikazane kot BB (homozigoten B), bb (homozigoten b) in Bb (heterozigoten). Alelna frekvenca se izračuna tako:

$$p = f(BB) + \frac{1}{2}f(Bb)$$

$$q = f(bb) + \frac{1}{2}f(Bb)$$

$$p + q = 1$$

Pri čemer so:

$f(BB)/f(Bb)/f(bb)$ = genotipske frekvence; p = frekvenca alela B; q = frekvenca alela b.

6.5.4.3.1.2 Alelna bogastvo (»Allelic richness«)

Ozadje

Število alelov (A) in alelna bogastvo (A_r) izražata količino variacij v populaciji. Ta je pomembna v smislu dolgoročnega ohranjanja, saj naj bi se populacije z večjo stopnjo genetske variabilnosti lažje odzivale na selekcijske pritiske in ohranjale zdravje osebkov (Petit in sod. 2008). A_r je prav tako lahko koristen kazalnik preteklih ozkih grl v populaciji ali zmanjšani velikosti populacije (Nei in sod. 1975).

A , ugotovljeno v proučevani populaciji, je odvisno od velikosti vzorca, saj večje vzorčenje poveča možnost, da se najdejo novi aleli. A_r se zato uporablja kot poseben primer A , korigiran za razlike v velikosti vzorca med populacijami s postopkom razredčitve (Kalinowski 2004).

Efektivno število alelov (A_e) izraža dejansko genetsko raznolikost številnih osebkov v populaciji. A_e je število alelov, ki bi jih pričakovali na vsakem lokusu v populaciji v skladu s Hardy-Weinbergovim ($H-W$) ravnovesjem. Zato je tesno povezano s pričakovano heterozigotnostjo populacije (H_e). Poznano je tudi kot Neijeva genetska raznolikost, D /genska raznolikost, v . Samo po sebi je poseben primer A_r , kot ga je opredelil Kalinowski (2004). Kot A_e je H_e delež heterozigotov, ki se pričakuje v skladu z ravnovesjem $H-W$ in ga je mogoče izračunati na podlagi teh načel. A_e je pogosto precej manjše od A , če alelne frekvence niso enake. Aleli z nizkimi frekvencami malo prispevajo k A_e . Vzrok so pogosto številne značilnosti populacije, kot so nihanja velikosti populacije med

generacijami, prekrivajoče se generacije, nenaključno opraševanje (spolna selekcija itd.), število potomcev osebkov, ki se razlikuje bolj kot naključno, in neenaka razmerja med spoloma.

Izračuni

Število alelov (A)

$$A = \left(\frac{1}{I}\right) \sum_{i=1}^I A_i \quad \text{Število alelov (A)}$$

$$Ap = \sum_{i=1}^I Ap_i \quad \text{Število privatnih alelov (Ap)}$$

Pri čemer je:

A = povprečno število alelov na lokus; A_i = število alelov na določenem lokusu; Ap = število privatnih alelov v populaciji; Ap_i = število privatnih alelov, najdenih v populaciji za določen lokus; I = skupno število upoštevanih lokusov; i = določen lokus.

Alelna bogastvo (A_r in pA_r)

$$N_j = \sum N_{gj} \quad \text{Velikost vzorca iz populacije j na lokusu i}$$

$$Q_{gjG} = \prod_{j'=1, j' \neq j}^G Q_{gj'G} \quad \text{Verjetnost, da v velikosti vzorca G iz populacije j ne bo najden noben alel vrste g}$$

$$P_{gjG} = 1 - Q_{gjG} \quad \text{Verjetnost, da bo v velikosti vzorca G iz populacije j najden vsaj en alel vrste g}$$

$$A_{ri} = \sum_{g=1}^G P_{gjG} \quad \text{Ocenjeno alelna bogastvo lokusa i v velikosti vzorca G iz populacije j}$$

$$A_r = \frac{\sum_{i=1}^I A_{ri}}{I} \quad \text{Povprečno alelna bogastvo vseh lokusov}$$

$$pA_{ri} = \sum_{g=1}^G \left[P_{gjG} \left(\prod_{j'=1, j' \neq j}^G Q_{gj'G} \right) \right] \quad \text{Ocenjeno bogastvo privatnih alelov na lokusu i v velikosti vzorca G iz populacije j}$$

$$pA_r = \frac{\sum_{i=1}^I pA_{ri}}{I} \quad \text{Povprečno bogastvo privatnih alelov vseh lokusov}$$

Pri čemer je:

N_j = velikost vzorca iz populacije j na danem lokusu i ; N_{gj} = število kopij alela g na lokusu i v enem samem osebk (vzorcu) iz populacije j ; g = določen alel znotraj lokusa i ; G = podvzorec upoštevanih alelov na lokusu i v populaciji j ; I = skupno število upoštevanih lokusov; i = določen lokus; Q_{gjG} = verjetnost, da v velikosti vzorca G iz populacije j ne bo najden noben alel vrste g ; P_{gjG} = možnost, da bo v velikosti vzorca G iz populacije j najden vsaj en alel vrste g ; A_{ri} = ocenjeno alelna bogastvo lokusa i v velikosti vzorca G iz populacije j ; A_r = povprečno alelna bogastvo vseh lokusov v populaciji j ; pA_{ri} = ocenjeno bogastvo privatnih alelov na lokusu i v velikosti vzorca G iz populacije J ; pA_r = povprečno bogastvo privatnih alelov vseh lokusov v populaciji j .

Efektivno število alelov (A_e)

A_e med vsemi lokusi v populaciji se izračuna kot aritmetična sredina vrednosti posameznih lokusov. Ker je A_e nelinearna funkcija pričakovane heterozigotnosti, ga je treba izračunati iz ocen za posamezne lokuse in ne iz celokupne heterozigotnosti.

$$H_o = \frac{\sum f(Bb)}{I}$$

Opažena heterozigotnost (H_o)

Za lokuse z dvema aleloma

$$H_{e_i} = 1 - p^2 - q^2 = 2pq$$

Pričakovana heterozigotnost na lokus (H_{e_i})

Za lokuse z dvema ali več kot dvema aleloma

$$H_{e_i} = 1 - \sum p_i^2$$

Pričakovana heterozigotnost na lokus (H_{e_i})

$$H_e = \frac{\sum_i H_{e_i}}{I}$$

Pričakovana heterozigotnost (H_e)

$$A_{e_i} = \frac{1}{\left(\frac{1}{H_{e_i}}\right)} = \frac{1}{\sum p_i^2}$$

Efektivno število alelov na lokus (A_{e_i})

Pri čemer je:

H_o = povprečna opažena heterozigotnost; H_{e_i} = pričakovana heterozigotnost za določen lokus; H_e = povprečna pričakovana heterozigotnost; A_{e_i} = efektivno število alelov za določen lokus; A_e = aritmetična sredina efektivnega števila alelov med vsemi lokusi v populaciji; I = skupno število upoštevanih lokusov; i = določen lokus.

6.5.4.3.1.3 Efektivna velikost populacije (N_e) («Effective population size«)

Ozadje

Efektivna velikost populacije (N_e) je koncept, namenjen merjenju obsega genetskega zdrsa, ki se pojavlja v populaciji ob določenem času. Je velikost idealizirane populacije (v skladu s Hardy-Weinbergovim ravnovesjem), pri kateri bi se heterozigotnost izgubila iz ene generacije v naslednjo z isto stopnjo kot pri opazovani populaciji. Populacije pogosto doživljajo dramatična nihanja v velikosti iz ene generacije v naslednjo (npr. ozka grla). To povzroči višje stopnje genetskega zdrsa, kot bi jih lahko pričakovali v dejanski velikosti populacije. Na N_e vplivajo tudi prekrivajoče se generacije, prostorska razporeditev osebkov in zelo različno število potomcev na »družino« (ki vodi v porazdelitev, ki ni Poissonova) in različna razmerja med spoli.

Izračun

Relativno preprost način obravnave N_e je izračun harmonične sredine dejanske velikosti populacij za vse upoštevane generacije. Uporablja se, ker je posebno občutljiva na najmanjše vrednosti v naboru podatkov in zato manjše pretekle populacije odraža bolje kot aritmetična sredina. Pri tem izračunu se upoštevajo samo nihanja velikosti populacije, vendar bo izračun nakazal N_e za uporabo pri dolgoročnem genetskem monitoringu, ki se preprosto izračuna iz demografskih podatkov.

$$N_e = \frac{1}{\frac{1}{T} \sum_{t=1}^T \frac{1}{N_t}}$$

Efektivna velikost populacije (N_e)

ALI

$$N_e = \frac{1}{\left(\sum_{t=1}^T \frac{1}{N_t}\right) / T}$$

Efektivna velikost populacije (N_e)

Pri čemer je:

N_e = efektivna velikost populacije; T = skupno število upoštevanih generacij; t = določena generacija; N_t = dejanska velikost populacije v generaciji t .

6.5.4.3.1.4 Latentni genetski potencial (LGP) («Latent genetic potential»)

Ozadje

Latentni genetski potencial (*LGP*) so prvi opredelili Bergmann in sod. (1990), da bi ločevali med fiziološkim in evolucijskim adaptivnim potencialom populacije. »Delovni genetski potencial« opisujejo kot del genetske sestave, ki zagotavlja preživetje populacije v trenutno prepoznanih razmerah in je podoben efektivnemu številu alelov (A_e/v). Preostala genetska sestava v tem okviru je trenutno »latentna«. Ta del genetske raznolikosti je povezan z aleli z nizko frekvenco v populaciji, ki imajo lahko veliko vlogo pri prilagoditvi in evoluciji v spreminjajočih se okoljskih razmerah. To bi bilo lahko posledično velikega pomena za prakse ohranjanja gozda (Aravanopoulos 2016). *LGP* zato predstavlja adaptivno sposobnost populacije, saj odraža razliko med opaženim in pričakovanim številom alelov v populaciji na vseh (opazovanih) lokusih.

LGP je bil uporabljen za sklepanje na potencial populacij, da se prilagodijo spreminjajočim se razmeram, in na negativne učinke stresnih dejavnikov na ta potencial. Izkazalo se je na primer, da so se z redčenjem stalnih populacij zmanjšali *LGP* in hipotetična multilokusna gametska raznolikost (v_{gam}) populacij (Rajora in sod. 2000), podoben učinek ima tudi razdrobljenost habitatov (O'Connell in sod. 2006). Izkazalo se je tudi, da je *LGP* občutljiv na druge stresne dejavnike, kot so gozdni požari (Rajora in Pluhar 2003).

Izračun

$$He_i = 1 - \sum p_i^2 \quad \text{Pričakovana heterozigotnost na lokus (He)}$$

$$Ae_i = \frac{1}{\left(\frac{1}{He_i}\right)} = \frac{1}{\sum p_i^2} \quad \text{Efektivno število alelov na lokus (Ae)}$$

$$LGP = \sum_i^l A_i - Ae_i \quad \text{Latentni genetski potencial (LGP)}$$

Pri čemer je:

He_i = pričakovana heterozigotnost za določen lokus; Ae_i = efektivno število alelov za določen lokus; A_i = opaženo število alelov za določen lokus; *LPG* = latentni genetski potencial populacije; p_i = alelna frekvenca alela na določenem lokusu; l = skupno število lokusov v populaciji; i = določen lokus.

6.5.4.3.1.5 Koeficient opraševanja med sorodniki (FIS) («Inbreeding coefficient»)

Ozadje

Koeficient opraševanja med sorodniki je F-statistika, izpeljana iz lokalnega F . To je mera pomanjkanja heterozigotov v populaciji, tj. količine heterozigotnosti, opažene v populaciji, v primerjavi s količino, pričakovano v skladu s Hardy-Weinbergovim načelom. F se lahko izračuna in razdeli za upoštevanje heterozigotnosti na različnih ravneh strukture populacije in pod vplivom različnih dejavnikov. Najpogosteje uporabljeni statistiki sta koeficient opraševanja med sorodniki (F_{IS}) in fiksacijski koeficient (F_{ST}). F_{IS} se nanaša na pomanjkanje heterozigotov, opaženo pri subpopulaciji, ki se lahko razdeli zaradi opraševanja med sorodniki, F_{ST} pa na pomanjkanje heterozigotov osebka v skupni populaciji, ki se lahko razdeli zaradi Wahlundovega učinka. F_{IS} je mogoče razumeti kot korelacijo med gametama, ki se združujeta, in gametami, naključno izbranimi iz subpopulacije.

Izračun

Za izračun F-statistike je treba najprej oceniti opaženo in pričakovano heterozigotnost populacije. To se prikaže kot povprečje na vseh lokusih znotraj populacije.

$$H o_i = f(Bb) \quad \text{Opažena heterozigotnost za lokus (Ho)}$$

$$H e_i = 1 - \sum p_i^2 \quad \text{Pričakovana heterozigotnost za lokus (He)}$$

$$F = \sum_{i=1}^l \frac{H o_i}{H e_i} / l \quad \text{Lokalni F}$$

$$F_{IS} = \sum_{i=1}^l \frac{H e_i - H o_i}{H e_i} / l \quad \text{Koeficient opravešvanja med sorodniki (F_{IS})}$$

Kjer

$H o_i$ = opažena heterozigotnost določenega lokusa; $H e_i$ = pričakovana heterozigotnost določenega lokusa; F = lokalni F za populacijo; F_{IS} = koeficient opravešvanja med sorodniki za populacijo; l = skupno število obravnavanih lokusov; i = določen lokus; p_i = frekvenca alela na določenem lokusu.

6.5.4.3.1.6 Vežavno neravnovesje (LD) («Linkage disequilibrium«)

Ozadje

Vežavno neravnovesje (*LD*) je nenaključno združevanje alelov na različnih lokusih v vsaki populaciji (Weir 1979). Pri vežavnem ravnovesju (*LE*) bi se aleli združevali naključno. *LD* je mogoče izračunati skupno za vse lokuse v populaciji in globalno ter v paru za vsak lokus. Na *LD* med lokusi lahko vplivajo številni dejavniki v populacijski genetiki, med drugim selekcija, pretok genov, genetski zdrs in mutacije, ter demografske značilnosti, na primer substruktura populacije, nespolno razmnoževanje, ozka grla in opravešvanje med sorodniki. V popolnoma ničelnih razmerah bi lokusi sčasoma bili v *LE*, vendar ti procesi omogočajo, da vztraja v populaciji (kot v pregledu podrobno opisuje Slatkin (2008)). Globalni *LD* v paru med lokusi je mogoče uporabiti za filtriranje markerjev pred izvajanjem drugih genetskih analiz.

Izračun

Pri obravnavi več lokusov je merjenje mogoče povzeti z eno mero, imenovano indeks asociacije (I_A). I_A je zaradi načina določanja V_o in V_e odvisen od opazovanega števila lokusov ter se vedno poveča, kadar se poveča to število. Agapow in Burt (2001) sta izboljšala to metodo, da bi upoštevala ta dejavnik, in uvedla nepristransko statistiko asociacije (d).

$$V_o = \sum var_{i^1} + 2 \sum \sum cov_{i^1, i^2} \quad \text{Opažena varianca parnih razdalj med lokusi (V_o)}$$

$$V_e = \sum var_i \quad \text{Pričakovana varianca parnih razdalj med lokusi (V_e)}$$

$$I_A = \frac{V_o}{V_e} - 1 \quad \text{Indeks asociacije (I_A)}$$

$$\bar{r}_d = \frac{\sum \sum cov_{i^1, i^2}}{\sum \sum \sqrt{var_{i^1} \cdot var_{i^2}}} \quad \text{Nepristranski indeks asociacije (r_d)}$$

Kjer

I_A = indeks asociacije med več lokusi v populaciji; V_e = pričakovana varianca razdalj v paru med lokusi pri vežavnem ravnovesju; V_o = opažena varianca parnih razdalj med lokusi; i = določen lokus; i^1/i^2 = dva nasprotna lokusa; var_i = varianca razdalj v paru med danimi lokusi in drugimi lokusi; Cov_{i^1, i^2} = kovarianca skupnih razdalj pri vsakem paru lokusov v naboru podatkov; r_d = nepristranski indeks asociacije.

6.5.4.3.1.7 Pretok genov (Nm) (»Gene flow«)

Ozadje

Pretok genov (migracija genov) je premik ali prenos genskega materiala (DNK) (z opraševanjem med sorodniki) iz ene populacije v drugo (imigracija ali emigracija), s pretokom genov pa se spremeni sestava genskega sklada (alelnih frekvenc) prevzemne populacije. Merjenje pretoka genov zagotavlja posredne informacije o stopnji migracije med subpopulacijami (Burczyk *et al.* 2004). Pretok genov (Nm) lahko razložimo kot efektivno število migrantov, ki se izmenjajo med demi na generacijo (Wright 1969). Obe metodi ocenjevanja Nm (na podlagi F_{ST} in privatnih alelov) predvidevata nevtralnost, zato bi kakršna koli selekcija povzročila neustrezne rezultate (Yamamichi in Innan 2012). Toda ocena Nm na podlagi F_{ST} in frekvenc privatnih alelov omogoča delno razumevanje migracij in je koristna pri gozdnem genetskem monitoringu, npr. visok Nm označuje visok pretok genov ter stabilnejše in nedotaknjene genetske procese.

Izračun

Wrightov model otoka (Wright 1931) in stopnja genetske diferenciacije (F_{ST}) med populacijami vrste, se uporabljata za izračun Nm – števila osebkov migrantov, ki vstopijo v populacijo vsako generacijo (Wright 1969).

$$Nm = \left(\frac{1 - F_{ST}}{4F_{ST}} \right)$$

Pretok genov lahko ocenimo tudi z metodo privatnih alelov (Slatkin 1985). Za to metodo potrebujemo večji vzorec, da pridobimo zadostno število privatnih alelov (alelov, ki se pojavljajo samo v eni populaciji). Metoda temelji na predpostavki, da bo pri visokem pretoku genov frekvenca privatnih alelov zelo nizka, ker so rezultat novih mutacij, za katere še ni minilo dovolj časa, da bi se razširile (Slatkin 1985, 1987). Slatkin (1985) je pokazal, da je logaritem Nm linearno povezan z algoritmom povprečne frekvence privatnih alelov. Pri projektu LIFE GENMON smo uporabili Slatkinovo (1985) metodo privatnih alelov, izvedeno v programski opremi GenePop (glejte spodaj). Ta izračuna multilokusno oceno efektivnega števila migrantov (Nm) na podlagi metode privatnih alelov. S to možnostjo dobimo multilokusno oceno efektivnega števila migrantov (Nm) v skladu s Slatkinom (1985) ter Slatkinom in Bartonom (1989). Dobimo štiri ocene, tri uporabljajo regresijske linije, objavljene pri Bartonu in Slatkinu (1986), popravljena ocena pa uporablja vrednosti najbližje regresijske linije, kot je opisano pri Bartonu in Slatkinu (1986).

Referenčna stran za GenePop: <https://kimura.univ-montp2.fr/~rousset/Genepop.htm>

GenePop je na voljo tudi kot paket R v omrežju CRAN in kot samostojna izvršljiva programska oprema. Obe temeljita na najnovejši različici virov C++ za GenePop, različica 4.7.3 (6. december 2019; Rousset 2008, Rousset 2017).

6.5.4.3.1.8 Multilokusna ocena opraševanja med nesorodnimi osebki (»Multilocus population outcrossing rate«)

Ozadje

Opraševanje med nesorodnimi osebki spodbuja pretok genov, homogenizira populacije ter povečuje heterozigotnost in vezavno ravnovesje gamet (Del Castillo in Trujillo 2008). Skupno multilokusno (t_m) in enolokusno (t_s) oceno opraševanja med nesorodnimi osebki lahko obravnavamo kot isti parameter. Toda točnejše ocene naravnega opraševanja med nesorodnimi osebki je treba oceniti z multilokusnimi modeli, na primer z modelom mešanega opraševanja (Ritland in Jain 1981, Ritland 2002). Multilokusna ocena opraševanja med nesorodnimi osebki (t_m) je ocena deleža potomstva, ki nastane z opraševanjem med nesorodnimi osebki kot potomstvo enega materinskega starša ali populacije kot celote, pri čemer dogodki opraševanja vključujejo opraševanje med sorodnimi in nesorodnimi osebki (Ritland 2002).

Izračun

Na podlagi modela mešanega opráševanja smo uporabili ocenjevalni postopek za ocene opráševanja med nesorodnimi osebki (t_s – enolokusne in t_m – multilokusne ocene opráševanja med nesorodnimi osebki) na podlagi enolokusnih in multilokusnih genotipov skladno z Ritlandom (2002). Multilokusna ocena opráševanja med nesorodnimi osebki (t_m) velja za točnejšo v primerjavi z enolokusnim ocenjevanjem (Ritland in Jain 1981, Ritland 2002). Multilokusno (t_m) in enolokusno (t_s) oceno opráševanja med nesorodnimi osebki lahko ocenimo s programsko opremo MLTR (Ritland 2002). Ocene varianc pri projektu LIFEGENMON so bile izračunane na podlagi 10.000 ponovitev zankanja (»bootstrapping«). Zankanje je neparametrična metoda, s katero poiščemo standardno napako (ali varianco) ocen. Metoda zankanja predvideva, da so opazovanja neodvisna, poleg tega potrebujemo ustrezno število opazovanj. Standardno napako ocenimo na podlagi izbranega števila ponovnih vzorčenj z zankanjem pri izračunu v programski opremi MLTR (Ritland 2002). Ponovno vzorčenje za metodo zankanja lahko opravimo znotraj družin ali pri osebkih znotraj družin (Ritland 2002). Pri projektu LIFEGENMON smo zankanje opravili na ravni družin, ker so se dejanski parametri sistema opráševanja razlikovali med družinami.

$$\hat{t}_m = 1 - \hat{s}_m$$

Multilokusna ocena opráševanja med nesorodnimi osebki za posamezen osebek

$$\hat{s}_m = \frac{I_m - P_m^s}{P_m^s - P_m^t}$$

Multilokusna ocena za stopnjo samooprašitve posameznega osebk

$$Var(\hat{s}_m) = \frac{P_m^t(1 - P_m^t)}{(P_m^s - P_m^t)^2}$$

Varianca multilokusne stopnje samooprašitve posameznega osebk

Pri čemer je:

je verjetnost opaženega m -tega možnega multilokusnega genotipa potomstva za dani genotip staršev; s v zgornjih enačbah označuje samooprašitev, t označuje opráševanje med nesorodnimi osebki. , če je genotip m opaženi genotip potomstva, in 0, če ni;

$$P_m^s = \prod_{loci} P_{kl(m)}^{ij,s}$$

$$P_m^t = \prod_{loci} P_{kl(m)}^{ij,t}$$

Pri čemer je:

P_{kl}^{ij} je verjetnost opaženega genotipa potomstva $A_k A_l$, za dani genotip staršev $A_i A_j$; s v zgornjih enačbah označuje samooprašitev, t označuje opráševanje med nesorodnimi osebki.

$$P_{kl}^{ij,s} = (2 - \delta_{kl}) D_k^{ij} D_l^{ij}$$

$$P_{kl}^{ij,t} = \frac{1}{2}(2 - \delta_{kl})(D_k^{ij} p_l + D_l^{ij} p_k)$$

Pri čemer je:

D_k^{ij} in D_l^{ij} sta verjetnosti, da se alel k ali alel l prenese na potomstvo, za dani genotip staršev $A_i A_j$; in sta frekvenci alelov l in k v populaciji; δ_{kl} je Kroneckerjev operator, ki je enak 1, če sta alela l in k enaka, ali 0, če sta različna.

$$D_k^{ij} = \left(\frac{\delta_{ik} + \delta_{jk}}{2} \right)$$

$$D_l^{ij} = \left(\frac{\delta_{il} + \delta_{jl}}{2} \right)$$

Multilokusna ocena opráševanja med nesorodnimi osebki (t_m) in enolokusna ocena opráševanja med nesorodnimi osebki (t_s) variirata od 0 do 1 (v nekaterih primerih $t_m = 1,2$ (rezultati projekta LIFEGENMON, neobjavljeno)). Če je multilokusna ocena opráševanja med nesorodnimi osebki (t_m) blizu ali enaka 1 ($t_m \geq 1$), to pomeni, da so potomci

nastali z opraševanjem med nesrodnimi osebki (brez samooprašitve). Če je multilokusna ocena opraševanja med nesrodnimi osebki (t_m) nižja od 1 ($t_m < 1$), je del potomcev nastal s samooprašitvijo.

Referenčna stran za MLTR: <http://kermittii.com/software/>

6.5.4.3.1.9 Dejanska stopnja opraševanja med sorodniki («Actual inbreeding rate»)

Ozadje

Opraševanje med sorodniki je opraševanje med osebki, ki so v sorodu. Opraševanje med sorodniki (opraševanje med bližnjimi sorodniki) povečuje homozigotnost potomcev in po navadi zmanjša njihov fitness. Pri homozigotnih genotipih so recesivni škodljivi aleli odkriti, koristne lastnosti heterozigotnosti na dominantnih lokusih pa se izgubijo (Aravanopoulos in Zsuffa 1998). Stopnja opraševanja med sorodniki prikazuje povečanje povprečne ravni opraševanja med sorodniki v populaciji od ene generacije do naslednje.

Izračun

Ocena dejanske stopnje opraševanja med sorodniki (enolokusne in multilokusne) temelji na podatkih o semenu in genetskih podatkih. Ocena stopenj opraševanja med sorodniki lahko temelji samo na markerjih, toda ker lahko potencialno zmanjšan fitness zaradi opraševanja med sorodniki negativno vpliva na semenitev in kalitev, je dejanska stopnja opraševanja med sorodniki zanesljivejša. Dejanska stopnja opraševanja med sorodniki se izračuna s kombiniranjem ocen samooprašitve (iz analize sistemov opraševanja) in ocen opraševanja med sorodniki na podlagi testiranja semen (Rajora in sod. 2000a).

$$\text{Dejanska stopnja opraševanja med sorodniki} = \frac{B + C \cdot \hat{s}_m}{B + C}$$

Pri čemer je:

B je ocenjen delež semen, nastalih z oprašitvijo med sorodnimi osebki in se izračuna kot $(1 - C) \cdot F$; F je ocenjen delež praznih (gluhih) semen, ki so posledica samooprašitve, za katerega vrednost poiščemo v objavljeni literaturi za dotično vrsto. Če podatki o parametru F za preiskovano vrsto niso na voljo, lahko upoštevamo, da je 80 % praznih semen nastalo zaradi samooprašitve, tj. $F = 0,8$ (Rajora in sod. 2000a, na osnovi podatkov za belo smreko (*Picea glauca* (Moench) Voss)); C je odstotek polnih semen (glejte razdelka 6.3 in 6.5.5.1.1 za razlago ugotavljanja odstotka polnih semen); \hat{s}_m je multilokusna ocena stopnje samooprašitve posameznega osebka (Ritland 2002), glejte razdelek 6.5.4.3.1.8 za izračun le-te.

6.5.4.3.2 Dodatne informacije

6.5.4.3.2.1 Medvrstna hibridizacija («Interspecific hybridisation»)

Ozadje

Medvrstna hibridizacija je hibridizacija, ki jo opazimo med organizmi, ki jih obravnavamo kot ločene vrste. Za ločevanje med čisto vrsto in medvrstnimi hibridi potrebujemo nabor preverjenih referenčnih vzorcev obeh (ali več) hibridizirajočih vrst. Podatke o genotipu čiste vrste je nato mogoče uporabiti za simuliranje hibridnih genotipov v programih, kakršen je *HybridLab* (Nielsen in sod. 2006), ali v jeziku R z uporabo paketa »adegenet« (Jombart 2008, Jombart in Ahmed 2011). »Čiste« in »hibridne« referenčne skupine je nato mogoče vključiti v analizo *STRUCTURE* (Pritchard in sod. 2000) ali drug program za razvrščanje v skupine, da ugotovimo stopnje hibridizacije med posameznimi vrstami v naravnih združbah.

STRUCTURE je samostojen program in ga ni lahko izvajati v jeziku R, poleg tega razmeroma počasi opravlja analize. Namesto tega lahko na podlagi jezika R uporabimo »snapclust« in diskriminantne analize glavnih komponent (DAPC), ki so komplementarne metode, ki se izvajajo ob uporabi paketa »adegenet« v jeziku R za razvrščanje vrst/populacij v skupine in prikazovanje teh skupin. Vsi trije opisani pristopi poskušajo razvrščati

osebke v skupine na podlagi genetske podobnosti in jih je mogoče uporabiti za ocenjevanje hibridizacije med vrstami ter osnovne genetske strukture in divergence populacije (ali pomanjkanja divergence, kar enačimo z mešanjem) med hipotetiziranimi populacijami znotraj vrste.

Če analiza hibridizacije razkrije visoko stopnjo hibridizacije (> 50 %) pri prvi oceni katere koli skupine vzorcev (odrasla drevesa, naravno mladje, semena), je treba upoštevati, da tak sestoj ni primeren za gozdni genetski monitoring, razen če je monitoring hibridizacije glavni namen monitoringa.

Povzetek algoritma *STRUCTURE*

STRUCTURE dodeljuje osebkem vrsti ali populacijski skupini tako, da uporablja modelno metodo razvrščanja v skupine in tako sklepa o strukturi populacije ob uporabi podatkov o genotipu, ki vsebujejo nepovezane markerje. *STRUCTURE* predvideva model s *K*-populacijami ali vrstami, od katerih je za vsako značilen nabor alelnih frekvenc na vsakem lokusu. Osebkam so verjetnostno dodeljeni populaciji/vrsti oziroma dvema ali več populacijam/vrstam na podlagi svojih genotipov. *STRUCTURE* ocenjuje alelne frekvence v vsaki skupini in članstvo v populaciji/vrsti za vsak posamezen vzorec. Permutacije Monte Carlo markovske verige se uporabljajo za integriranje v prostor parametrov in dodeljevanje v skupine. Optimalna vrednost *K* za nabor osebkov se določi *post hoc* z Evannovo metodo strukture (Evanno in sod. 2005). Analizo *STRUCTURE* je zato treba izvesti za številne vrednosti *K*, tako da se podaljša časovno obdobje, potrebno za izvedbo. *STRUCTURE* predvideva Hardy-Weinbergovo in vezavno ravnovesje, zato je treba pred analizo filtrirati osebkem in lokuse, ki pomenijo odklon od teh predpostavk.

Povzetek algoritma *Snapclust*

Snapclust (izveden v paketu »adegenet«, (Jombart 2008, Jombart in Ahmed 2011)) je pristop za razvrščanje v skupine na osnovi genetskih podatkov, ki združuje »modelne« in »geometrijske« metode za dodeljevanje osebkov v skupine, svoje delo pa opravlja hitreje kot samo »modelni« pristopi, vključno z analizo *STRUCTURE*. *Snapclust* upošteva Hardy-Weinbergovo ravnovesje za izračunavanje verjetnosti dane rešitve razvrščanja v skupine.

Snapclust dodeli skupine osebkom (na podlagi števila skupin, ki ga navede uporabnik, *K*) in nato izvede številne ponovitve modela *Snapclust*, ob tem pa vsakič znova dodeli osebkem, dokler dva zaporedna modela ne konvergirata (tj. logaritmi verjetja pri dveh zaporednih ponovitvah postanejo zanemarljivi (10^{-10})).

Poleg tega je treba pri orodju *Snapclust* skupno število prisotnih skupin določiti *a priori*. To je ravno obratno kot pri analizi *STRUCTURE*, pri kateri se to naredi *post hoc*. Za oceno optimalnega števila skupin lahko uporabimo več informacijskih kriterijev. Pogosti statistiki sta Akaikejev informacijski kriterij (AIC) (Akaike in sod. 1998) in Bayesov informacijski kriterij (BIC) (Schwarz 1978). Ti dve statistiki merita devianco modela (neujemanje), vendar različno obravnavata kompleksnost nabora podatkov. Če uporabljamo ti statistiki za ugotavljanje optimalnega števila skupin za nabor podatkov, se model *Snapclust* ponovi za več potencialnih vrednosti *K* (npr. 1–20), izbrana statistika oziroma statistike pa se izračunajo za vsak dobljen model. Podatke je nato mogoče vnesti in primerjati statistične vrednosti med modeli. V splošnem nižje vrednosti vsake statistike kažejo na boljše ujemanje modela, vendar je v praksi najverjetnejše optimalno število skupin enako vrednosti *K*, pri kateri pride do izrazitega zmanjšanja vrednosti uporabljene statistike (prelom) (Jombart in sod. 2010).

Diskriminantna analiza glavnih komponent (DAPC)

DAPC uporablja analizo glavnih komponent (PCA) skupaj z diskriminantno analizo (DA) za odkrivanje genetskih struktur. Od drugih pristopov, med drugim orodja *Snapclust* in analize *STRUCTURE*, se razlikuje po tem, da je popolnoma »geometrijski pristop«, pri katerem se osebkem razvrščajo v skupine na podlagi medsebojnih genetskih razdalj brez prevzemanja posebnih modelov populacijske genetike (Jombart in sod. 2010).

Kot je podrobno pojasnjeno v raziskavi, ki predstavlja ta pristop (Jombart in sod. 2010), DAPC poskuša zmanjšati omejitve obeh tehnik, ki ga sestavljata. PCA lahko povzame skupno variabilnost osebkov, vendar ne more ločevati med divergenco med skupinami in znotraj skupin. DA pa lahko razdeli genetsko variabilnost v komponento med skupinami in komponento znotraj skupine ter poskuša maksimirati prvo in minimizirati drugo, da omogoči ločevanje osebkov v vnaprej določene skupine. DA je omejena, ker mora biti število spremenljivk (alelov) nižje od

števila opazovanj (osebkov), vendar to pogosto ni tako pri naborih podatkov SNP, poleg tega jo omejujejo tudi korelacije med spremenljivkami, kar je pogosto pri naborih združenih podatkov. Pri analizi DAPC se podatki najprej preoblikujejo z uporabo analize PCA, nato se vrednosti spremenljivk (z uporabo vsake osi PCA) predložijo za analizo DA. Tako zagotovimo, da spremenljivke, predložene za analizo DA, niso v korelaciji in da jih je manj kot analiziranih osebkov. Analizo DAPC je mogoče uporabiti za dopolnitev analize *Snapclust* kot metodo za prikaz raznovrstnosti *a priori* skupin (iz analize *Snapclust*) v omejenem prostoru, namesto kot metodo za dodelitev osebkov skupinam.

6.5.4.3.2.2 Množičnost – hipotetična multilokusna gametska raznolikost (V_{gam}) (»Multiplicity – Hypothetical gametic multilocus diversity«)

Ozadje

Hipotetična multilokusna gametska raznolikost (v_{gam}) je posebna genetska raznolikost, ki označuje potencialno raznolikost nastalih gamet v populaciji. Označuje adaptivni/evolucijski potencial spolno reproduktivne populacije oziroma efektivno število multilokusnih gamet, ki lahko nastanejo (Gregorius 1978). Pri izračunu v_{gam} predvidevamo, da so ocenjevani lokusi v vezavnem ravnovesju in da ni selekcije za večjo plodnost v populaciji (tj. osebki nimajo večjega fitnesa zaradi lastnosti, ki povečujejo število potomcev) (Hattermer 1991). Torej gre samo za hipotetično oceno te sposobnosti.

Genetska variabilnost v populaciji je nujna za prilagoditev in preživetje v heterogenih okoljih (Müller-Starck 1995). Kot mera zmožnosti populacije za ustvarjanje genetske variabilnosti in omogočanje prilagajanja na spreminjajoče se okoljske razmere (Gregorius in sod. 1986) lahko v_{gam} prikaže odziv populacije na dolgoročne stresne dejavnike okolja in zmožnost prenašanja teh dejavnikov. To je bilo prikazano pri navadni bukvi (*Fagus sylvatica*), pri kateri so imele subpopulacije, ki so bile »odpornejše na onesnaženost zraka«, 90 % višjo v_{gam} kakor »občutljivejše« subpopulacije (Müller-Starck 1989). Poleg tega so Wickneswari in sod. (2004) v_{gam} uporabili za prikaz potencialnega zmanjšanja zmožnosti prilagajanja genskega sklada na spreminjajoče se razmere po antropogenih motnjah, na primer sečnji.

Izračun

V_{gam} se izračuna kot zmnožek vseh enolokusnih raznolikosti (Ae) na vseh lokusih. Zato je treba najprej izračunati He in Ae za vsak lokus.

$$He_i = 1 - \sum p_i^2 \quad \text{Pričakovana heterozigotnost za lokus (He)}$$

$$Ae_i = \frac{1}{(1/He_i)} = \frac{1}{\sum p_i^2} \quad \text{Pričakovano število alelov za lokus (Ae)}$$

$$v_{gam} = \prod_i Ae_i \quad \text{Hipotetična multilokusna gametska raznolikost (v_{gam})}$$

Kjer:

p_i = alelna frekvenca najpogostejšega alela na danem lokusu; He_i = pričakovana heterozigotnost na določenem lokusu; Ae_i = pričakovano število alelov na določenem lokusu; v_{gam} = hipotetična multilokusna gametska raznolikost; I = skupno število nepovezanih lokusov; i = določen lokus.

6.5.4.3.2.3 Odkrivanje osamelcev z F-statistiko

Ozadje

Genetske markerje lahko razdelimo v dve kategoriji na podlagi tega, ali predvidevamo, da bodo nanje vplivali selekcijski pritiski, ali ne. Nevtralni markerji so tisti, ki ne (ali zelo malo) vplivajo na fitnes in jih zato usmerjajo stohastični nevtralni procesi namesto naravnih (ali umetnih) selekcijskih pritiskov (Kimura 1983). Markerji, na

katere deluje selekcijski pritisk, pa so nenevtralni, adaptivni ali lokusi osamelci. Vse več je zanimanja za uporabo nenevtralnih markerjev skupaj z nevtralnimi markerji za ocenjevanje adaptivnega potenciala populacije na spreminjajoče se okoljske razmere (Eizaguirre in Baltazar-Soares 2014) in pri genetskem monitoringu (Funk in sod. 2012). Toda tradicionalne analize populacijske genetike se večinoma izvajajo samo za nevtralne markerje, ki odražajo geografsko strukturo subpopulacij in genetsko povezanost, na katero vplivajo genetski zdrsi, mutacije in omejitve širjenja. Zato so nevtralni markerji uporabni za ocenjevanje preteklih demografskih procesov.

Glavni pristop, ki se uporablja za odkrivanje znakov naravne selekcije v populaciji, je iskanje lokusov z nepričakovano velikimi razlikami v alelnih frekvencah med populacijami (Lewontin in Krakauer 1973). Testiranje osamelcev po navadi izvajamo z metodo določanja osamelcev F_{ST} (fiksacijski indeks) v samostojnih aplikacijah, na primer *Lositan* (Antao in sod. 2008) in *Bayescan* (Fischer in sod. 2011). V jeziku R odkrivanje osamelcev F_{ST} preprosto in hitro izvedemo z metodo *OutFLANK* (Whitlock in Lotterhos 2015).

Povzetek algoritma

V nadaljevanju sledi poenostavljen opis algoritma *OutFLANK*, za podrobnejši opis glejte izvorno raziskavo (Whitlock in Lotterhos 2015). V algoritmu *OutFLANK* se najprej odstranijo lokusi z nizko heterozigotnostjo (tj. $He < 0,1$ v celotni populaciji in frekvenca redkih alelov $< 5\%$). F'_{ST} se izračuna kot izbrana mera genetske diferenciacije za vsak lokus in povpreči za vse obravnavane lokuse. To je variacija fiksacijskega indeksa (F_{ST}) skladno z definicijo Weirja in Cockerhama (1984), ki se ne popravi za velikost vzorca pri izračunu komponente variance.

$$F_{st} = \frac{var_a}{var_a + var_b + var_c} \quad F_{ST} \text{ (Weir in Cockerham 1984)}$$

Kjer:

var_a = komponenta variance alela med populacijami; var_b = komponente variance med osebki znotraj subpopulacij; var_c = komponente variance med gametami znotraj osebkov.

Lokuse v zgornjih in spodnjih 5 % vrednosti F'_{ST} začasno zavržemo. Iz uravnoveženih vrednosti F'_{ST} sestavimo model porazdelitve X^2 . Verjetnostni model na podlagi porazdelitve vrednosti F'_{ST} se nato uporabi za iskanje prostostnih stopenj (df) modela. Ko sta znani ničelna porazdelitev X^2 vrednosti F'_{ST} in df , je to porazdelitev mogoče uporabiti za testiranje disruptivne selekcije, pri čemer vrednosti F'_{ST} odpadejo na desni konec porazdelitve. To se večkrat ponovi z odstranjevanjem lokusov osamelcev, ko jih odkrijemo, dokler ne najdemo več nobenih novih lokusov osamelcev.

5.4.4.3.2.4 Efektivno število donorjev peloda (N_{ep}) («Effective number of pollen donors«)

Ozadje

Efektivno število donorjev peloda je število donorjev peloda, ki prispevajo k posamezni družini semen. Viri peloda niso zastopani enakovredno med potomci, zato je to število precej manjše od absolutnega števila donorjev peloda (Smouse in Sork 2004, Sork in Smouse 2006, Sork in sod. 1999). Efektivno število donorjev peloda je odličen kazalnik genetske raznolikosti semenskega obroda. Če je število donorjev peloda majhno, so lahko potomci genetsko manj raznoliki (Apsit in sod. 2002).

Izračun

Efektivno število donorjev peloda (N_{ep}), ki prispevajo k posamezni družini semen, je mogoče oceniti na podlagi multilokusne korelacije očetovstva (rp), ki se oceni s programsko opremo MLTR (Ritland 2002) in s to formulo:

$$N_{ep} = \frac{1}{rp}$$

Kjer je rp korelacija očetovstva v programski opremi MLTR (Ritland 2002).

Referenčna stran za MLTR: <http://kermizii.com/software/>

6.5.4.3.2.5 Opraševanje med sorodnimi starši (BI) (»Biparental inbreeding«)

Ozadje

Opraševanje med sorodniki poteka različno pogosto v številnih naravnih rastlinskih populacijah, kar pogosto vključuje tudi precej visoko stopnjo samooprašitve (Ritland 2002, Porcher in Lande 2016). V nasprotju z naključnim opraševanjem se opraševanje med sorodnimi starši kaže kot navidezna samooprašitev ali povečana homozigotnost (Ritland 2002). Zato je stopnja opraševanja med sorodnimi starši pomemben parameter za varstveno genetiko in genetski monitoring.

Izračun

Enolokusne (t_s) in multilokusne (t_m) ocene opraševanja med nesorodnimi osebki se uporabljajo za izračun opraševanja med sorodnimi starši (BI).

$$BI = (t_m - t_s)$$

Kjer je t_m multilokusna ocena opraševanja med nesorodnimi osebki, t_s pa je enolokusna ocena opraševanja med nesorodnimi osebki v programski opremi MLTR (Ritland 2002).

Po Ritlandu (2002) lahko tudi takrat, kadar je prisotna prava samooprašitev, za oceno stopnje opraševanja med sorodnimi starši uporabimo razliko med multilokusno (t_m) in enolokusno (t_s) oceno opraševanja med nesorodnimi osebki. Toda Ritland (2002) pravi, da je ta razlika vedno prenizko ocenjena, saj je odvisna od števila uporabljenih lokusov. Večje število lokusov torej omogoča ocene opraševanja med sorodniki, ki so bližje resnični vrednosti (Ritland 2002).

Opraševanje med sorodniki je mogoče oceniti s programsko opremo MLTR na podlagi števila ponovnih vzorčenj z zankanjem (»bootstrapping«) (Ritland 2002). Ponovno vzorčenje z zankanjem je metoda, s katero brez parametrov poiščemo standardno napako (ali varianco) ocen. Metoda zankanja predvideva, da so opazovanja neodvisna, poleg tega potrebujemo ustrezno število opazovanj. Standardno napako ocenimo na podlagi izbranega števila ponovnih vzorčenj pri izračunu s programsko opremo MLTR (Ritland 2002). Ponovno vzorčenje z metodo zankanja lahko opravimo znotraj družin ali pri osebkih znotraj družin (Ritland 2002). Pri projektu LIFEGENMON smo ponovno vzorčenje opravili na ravni družin, ker so se dejanski parametri sistema opraševanja razlikovali med družinami. Z razliko med ocenama ($t_m - t_s$) tako dobimo mero frekvence dogodkov opraševanja med bližnjimi sorodniki (Ritland 2002).

Referenčna stran za MLTR: <http://kermizii.com/software/>

Če se pojavi opraševanje med sorodnimi starši, mora biti enolokusna stopnja samooprašitve višja od multilokusne stopnje samooprašitve, razlika pa je minimalna ocena navidezne samooprašitve zaradi opraševanja med sorodnimi starši (Ritland 2002). Če je vrednost opraševanja med sorodnimi starši blizu ničle, to pomeni, da ni bilo opraševanja med sorodniki. Če je torej enolokusna (t_s) ocena opraševanja med nesorodnimi osebki nekoliko nižja od multilokusne ocene opraševanja med nesorodnimi osebki ($t_s < t_m$), je verjetnost opraševanja med sorodniki majhna.

6.5.4.3 Uporabljen programski oprema in paketi

Preglednica 6.9: Programska oprema in paketi, ki jih potrebujemo za izračun verifikatorjev in dodatnih informacij. Če je izvajanje paketov R odvisno od drugih paketov, so vključeni tudi ti paketi. Če paketi R uvažajo funkcije iz drugih paketov, ti niso bili vključeni, saj je funkcije mogoče uporabljati v paketu, ki jih uvažata. Paketi so navedeni z viri samo ob prvi omenbi v preglednici, da prihranimo prostor in zagotovimo berljivost.

Verifikator	Zahtevana programska oprema/paketi
1. Alelna frekvenca	Programska oprema R: <i>adegenet</i> (Jombart 2008, Jombart in Ahmed 2011), <i>ade4</i> (Dray in Dufour 2007)
2. Alelna bogastvo	Programska oprema R: <i>custom function</i> (Dupuis in sod. 2018); <i>matrixStats</i> (Bengtsson 2014), <i>dplyr</i> (Wickham in sod. 2015), <i>pegas</i> (Paradis 2010), <i>adegenet</i> , <i>ape</i> , <i>ggplot2</i> (Wickham 2016), <i>DescTools</i> (Signorell 2020), <i>PopGenReport</i> (Adamack in Gruber 2014), <i>knitr</i> (Xie 2020), <i>poppr</i> (Kamvar in sod. 2014), <i>mmod</i> (Winter 2012)
3. Efektivna velikost populacije	Programska oprema R: <i>custom function</i> , <i>adegenet</i> , <i>ade4</i>
4. Latentni genetski potencial	Programska oprema R: <i>poppr</i> , <i>adegenet</i> , <i>ade4</i> , <i>custom function</i>
5. Koeficient opraševanja med sorodniki	Programska oprema R: <i>hierfstat</i> (Goudet 2005), <i>matrixStats</i>
6. Vezavno neravnovesje	Programska oprema R: <i>poppr</i> , <i>adegenet</i> , <i>ade4</i>
7. Multilokusna ocena opraševanja med nesorodnimi osebki	Programska oprema MLTR (Ritland 2002)
8. Pretok genov (Nm)	Programska oprema GenePop je na voljo kot samostojna izvršljiva programska oprema (Rousset 2008, Rousset 2017) Programska oprema GenePop je na voljo tudi kot paket R v omrežju CRAN, obe temeljita na najnovejši različici virov C++ za GenePop, različica 4.7.3 (6. december 2019; Rousset 2008, Rousset 2017)
Dodatne informacije	
9. Medvrstna hibridizacija	Programska oprema <i>STRUCTURE</i> (Pritchard in sod. 2000, Hubisz in sod. 2009) Programska oprema R: <i>pophelper</i> (Francis 2017), <i>dplyr</i> , <i>tidyr</i> (Wickham in Henry 2020), <i>gridExtra</i> (Baptiste 2020), <i>plyr</i> , <i>adegenet</i> , <i>ade4</i> , <i>ggplot2</i> , <i>cairo</i> (Urbanek in Horner 2020)
10. Hipotetična multilokusna gametska raznolikost	Programska oprema R: <i>poppr</i> , <i>adegenet</i> , <i>ade4</i> , <i>custom function</i>
11. Odkrivanje osamelcev s F-statistiko	Programska oprema R: <i>dartR</i> (Gruber in sod. 2018), <i>adegenet</i> , <i>ade4</i>
12. Opraševanje med sorodnimi starši	Programska oprema MLTR (Ritland 2002)
13. Efektivno število donorjev peloda (Nep)	Programska oprema MLTR (Ritland 2002) in upoštevanje Ritlandove formule (1989)

Opomba: *poppr*, *dartR* in *pegas* so odvisni od programa *adegenet*. *adegenet* je odvisen od programa *ade4*. *pophelper* je odvisen od programov *cairo* in *ggplot2*. *PopGenReport* je odvisen od programov *adegenet* in *knitr*.

6.5.4.4 *easyRpopgen*: skripta R za izračun genetskih parametrov iz podatkov SSR in SNP

6.5.4.4.1 Namen

easyRpopgen je odprtokodna spletna aplikacija paketa Shiny, zasnovana tako, da omogoča analizo in interpretacijo rezultatov iz raziskav populacijske genetike, zlasti v okolju R. Aplikacija lahko uspešno obdela pogoste genetske markerje, na primer polimorfizme enega nukleotida (SNP) in mikrosatelitnih markerjev (SSR). Za ta namen je mogoče uporabiti številne samostojne programe (npr. GenAlEx) ter pakete R v omrežju CRAN in drugih shrambah, vendar moramo med izvedbenim postopkom celovite analize pogosto uporabljati različne programe za različne naloge ali poiskati ustrezen paket R za izvedbo zahtevane funkcije. To postane zapleteno zaradi velikega števila razpoložljivih paketov R, ki vsebujejo veliko prekrivajočih se in posebnih funkcij ter namenov. Raziskovalci lahko za združevanje teh paketov in funkcij porabijo veliko časa, poleg tega je to delo naporno in tudi težko razumljivo, zlasti za tiste, ki še ne poznajo platforme za kodiranje R.

easyRpopgen poenostavi in optimizira ta proces tako, da združuje funkcije več omenjenih paketov in tudi dodatne funkcije ter ustvari nov izvedbeni postopek, ki je robusten in razumljiv za splošnega uporabnika. *easyRpopgen*

temelji na paketih R za genetsko analizo, med drugim na paketih *poppr*, *ade4*, *adegenet*, *pegas*, *hierfstat* in *PopGenReport*, ter združuje njihove nepovezane funkcije v popolnoma uporabno platformo za analizo.

Aplikacija je od same zasnove namenjena temu, da se uporablja kot sestavni del analize podatkov in predstavljanja rezultatov v okviru projekta LIFEGENMON ter kot samostojna aplikacija, ki jo lahko uporabljajo zainteresirani raziskovalci, ki se ukvarjajo s tem področjem. Torej je prilagojena raziskovalnim vprašanjem in metodologijam, uporabljenim v okviru tega projekta, vendar je dovolj splošna, da bodo analize, ki se izvajajo s paketom *easyRpopgen*, koristne tudi za številne druge raziskovalce.

6.5.4.4.2 Pregled aplikacije

Uvoz in filtriranje podatkov

Podatke genetskih markerjev je mogoče uvoziti iz datotek .csv v formatu programov GenAIEx ali STRUCTURE. Datoteke z uvoženimi podatki se pretvorijo v objekt »genind«, glavni objekt za genetske podatke, katerega uporabljajo številne knjižnice v R-u. Ta objekt za shranjevanje podatkov lahko obravnava podatke SNP in SSR ter z njimi povezane metapodatke, tako da se le-ti prenašajo skozi vse stopnje analize. V okviru projekta LIFEGENMON lahko poleg tega, da uvozimo podatke iz teh pogostih oblik zapisa, podatke tudi neposredno uvozimo v aplikacijo iz podatkovne zbirke LIFEGENMON, vključno s fenološkimi podatki.

Uporabnik pri uvažanju podatkov določi prepoznavno oznako (ID) projekta (npr. LGM_Abies), ki bo povezan z vsemi datotekami in poročili, ki se bodo nato prenesla iz aplikacije. Tako zagotovimo preprosto sledenje fazam analize, ki so se izvedle za vsak projekt.

Ob uvozu podatkov lahko določimo stratume ali podpopulacije. Ta možnost je uporabna tako za projekt LIFEGENMON kot za splošno rabo. Populacije, določene v projektu, so stratificirane po lokaciji (Slovenija, Nemčija in Grčija) ter po starostni kohorti (odrasli osebk, naravno mladje in semena). Neodvisno določanje stratumov pomeni, da je mogoče izvajati analize ob upoštevanju interaktivnih in ugnezdenih vplivov.

Filtriranje podatkov je mogoče izvajati za podatke pred kakršno koli analizo podatkov. Parametri filtriranja vključujejo manjkajoče podatke (manjkajoči lokusi in manjkajoči osebki), frekvenco redkih alelov, globalno vezavno neravnovesje in Hardy-Weinbergovo ravnovesje (HW). Namen korakov filtriranja je odstraniti nepopolne podatke, ki lahko nesorazmerno vplivajo na rezultate analize, ter odstraniti potencialno nepravilno sekvencirane podatke, in to tako, da odstranimo tiste z vzorcem velikega odklona od HW pri večini vzorcev. Z odstranitvijo lokusov v vezavnem neravnovesju odstranimo tudi njihov vpliv na rezultate, saj številne analize zahtevajo, da so lokusi v ravnovesju, tisti v neravnovesju pa dejansko delujejo kot podvojen podatek. Uporabniki se lahko odločijo za izvedbo nekaterih ali vseh korakov filtriranja, poleg tega se lahko odločijo, kako strogo želijo filtrirati glede stopnje manjkajočih podatkov in frekvence redkih alelov. To se nanaša na uporabnikove prednostne nastavitve za filtriranje in na to, da se nekateri podatki uvozijo v aplikacijo že vnaprej filtrirani.

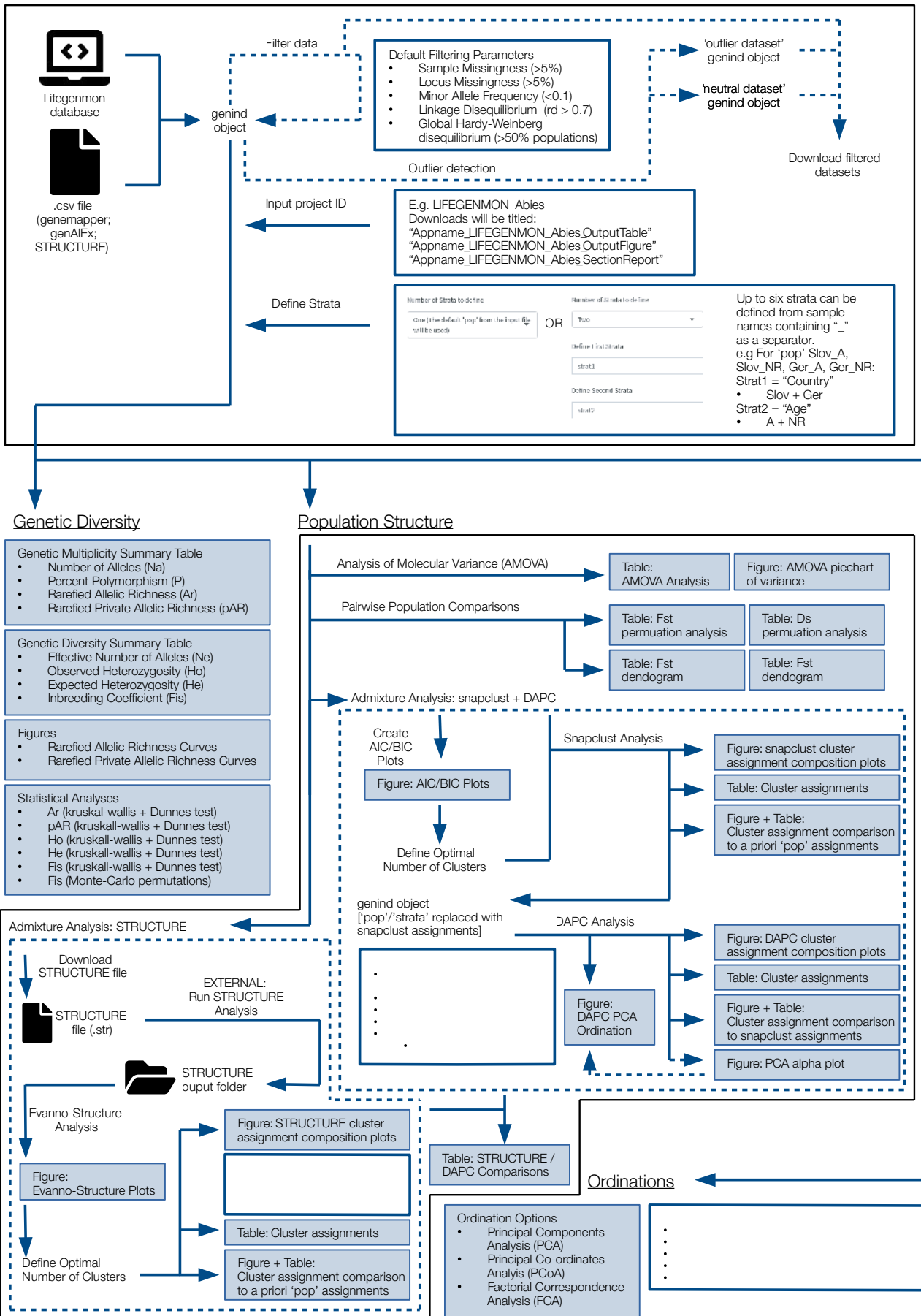
Pri filtriranju je odkrivanje osamelcev mogoče izvajati tudi s paketom R »pcadapt«. Ustvarita se dva nabora podatkov za izvoz – »nevtralni« nabor podatkov, sestavljen iz markerjev, ki niso pod vplivom selekcije, in nabor podatkov »osamelcev«, sestavljen iz tistih, ki so pod vplivom selekcijskega pritiska. Tako je mogoča razmejitev med demografskimi vplivi in vplivi procesa selekcije na divergenco populacije. Če se odkrivanje osamelcev ne izvede ali se korak filtriranja popolnoma preskoči, bo v vseh nadaljnjih korakih uporabljen nefiltriran celoten nabor uvoženih podatkov.

Analiza podatkov in ustvarjanje poročila

Genetska analiza je razdeljena na tri ločene razdelke v aplikaciji:

- genetska raznolikost,
- struktura populacije,
- ordinacije.

Data import and Filtering



Slika 6.6: Shematični prikaz genetskih analiz, ki jih izvaja aplikacija easyRpopgen.

Metrike, ustvarjene v tej fazi, so opisane v prejšnjem razdelku priročnika (Verifikatorji), zato jih podrobno ne bomo opisovali. Izračuni metrik in statistične analize, ki jih izvede aplikacija, so povzeti v »shematičnem prikazu genetske analize« (Slika 6.6). Tri razdelke genetskih analiz – in številne povezane izračune – je mogoče opraviti ločeno v skladu s potrebami uporabnika aplikacije. Tudi vsako ustvarjeno sliko in preglednico je mogoče prenesti ločeno, mogoče pa je ustvariti tudi celovito poročilo razdelka, ki vsebuje vse ustvarjene rezultate.

Fenološki podatki se obdelujejo v delu aplikacije, namenjenem dejavnostim v zvezi s projektom LIFEGENMON, za dostop do njih pa se je treba vpisati. V tem razdelku je mogoče prenesti fenološke podatke iz podatkovne zbirke ter jih primerjati po lokacijah in letih. Podobno kot pri analizi genetskih podatkov je tudi za te analize mogoče ustvariti poročilo.

Vse analize v aplikaciji je mogoče opraviti preprosto s pritiskom gumba in za izvedbo teh analiz ni treba poznati jezika R. Koda R se izvaja v ozadju, aplikacija pa uporabniku prikazuje samo ustvarjene grafe in preglednice. Zaradi preglednosti in ponovljivosti lahko uporabnik pridobi dostop tudi do uporabljenih skript R.

6.5.5 Analiza podatkov testiranja semena

6.5.5.1 Verifikatorji

6.5.5.1.1 Odstotek polnih semen

Ozadje

Odstotek polnih semen se oceni za drevo, katerega plodovi/semena so bili vzorčeni. Spremenjen odstotek polnih semen med skupinami kaže na potencialni selekcijski pritisk (če gre za zmanjšanje) ali na okrevanje (če gre za povečanje). Odstotek polnih semen je pomemben parameter tudi pri interpretaciji vrednosti efektivne velikosti populacije naslednje skupine.

Izračun

Ocena temelji na številu polnih semen v naključnem vzorcu semen (običajno 400), ki se uporabijo za izvedbo testa kalivosti (TK) ali biokemičnega testa viabilnosti (TT), pretvorjeno v odstotek. Odstotek polnih semen lahko izračunamo tudi po enačbi 1 – delež praznih semen, kar se tudi določa ob zaključku TK in TT.

6.5.5.1.2 Odstotek kalitve

Ozadje

Odstotek kalitve pomeni delež semen, ki so v razmerah, značilnih za posamezno vrsto, in v določenem obdobju tvorila klice, ki jih razvrščamo med normalne (ISTA 2020). Test kalivosti se običajno uporablja za oceno deleža semen, ki bodo vzklila v ugodnih razmerah in tvorila normalne klice, ki imajo življenjsko pomembne strukture (korenine, poganjke in dovolj zaloga hrane) in so se zmožne razviti v reproduktivno zrele rastline. Po pravilih ISTA (2020) iz čistega semena naključno vzamemo 400 semen v ponovitvah po 100. Trajanje testa je pri posameznih vrstah različno in ga je po potrebi mogoče podaljšati skladno s pravili ISTA. Vsako klico je treba oceniti skladno s splošnimi načeli (ISTA 2020). Ko so štiri ponovitve po 100 semen znotraj največjega dovoljenega razpona, povprečje pomeni odstotek kalitve, ki se navede. Semena, ki ob testiranju v posebnih razmerah niso vzklila do konca testnega obdobja, se razvrstijo v te kategorije: trda semena, sveža semena, mrtva semena, druge kategorije (v nekaterih okoliščinah lahko prazna semena in semena, ki niso vzklila, dodatno razvrstimo v razrede, ki so opisani v pravilih ISTA (2020)).

Izračun

Rezultat testa kalivosti se izračuna kot povprečje štirih ponovitev po 100 semen. Prikazan je kot odstotek normalnih klic. Odstotek se zaokroži na najbližje celo število (0,5 se zaokroži navzgor). Odstotek nenormalnih klic ter trdih, svežih, mrtvih in praznih semen se izračuna na enak način. Vsota odstotkov normalnih in nenormalnih klic ter semen, ki niso vzklila, mora biti 100 (ISTA 2020).

Namesto testa kalivosti je za vrste z dolgotrajno dormanco semen mogoče uporabiti test viabilnosti (test s tetrazolom). Tudi tu uporabimo štiri ponovitve po 100 semen in obdelamo podatke, kot je podrobno opisano v pravilih ISTA (2020). Število semen, ki veljajo za viabilna, se določi pri vsaki ponovitvi, odstotek viabilnih semen pa se izračuna po zgornjih navodilih. Odstotka semen, ki niso viabilna, in praznih semen se izračunata na enak način.

6.5.6 Ključni verifikatorji

Pri procesu gozdnega genetskega monitoringa z ocenjevanjem treh kazalnikov več verifikatorjev velja za tipične verifikatorje ali dodatne informacije. Veljajo tudi za sheme monitoringa – osnovno, standardno ali napredno. Med vsemi verifikatorji trije veljajo za »ključne verifikatorje«, tj. pomembnejši so od drugih. Določitev ključnih verifikatorjev je za genetski monitoring še zlasti pomembna pri interpretaciji vrednosti (glejte poglavje 6.5.6 v nadaljevanju).

Za ocenjevanje kazalnika »selekcija« so najpomembnejši verifikatorji tisti, ki so navedeni za osnovno raven. Med njimi velja obilnost naravnega mladja za najpomembnejšo. Obilnost mladja odraža udejanjen fitnes na ravni sestoja. Je udejanjen rezultat cvetenja, obroda, lastnosti semen in mladja, in ko je prisotna, lahko prevlada nad mortaliteto odraslih dreves. Zato ta verifikator velja za ključni verifikator za kazalnik »selekcija«.

Za kazalnik »genetska variabilnost« so najpomembnejši verifikatorji tisti, ki so navedeni na standardni ravni. Med njimi velja za najpomembnejšo učinkovita velikost populacije. Zmanjšanje učinkovite velikosti populacije pod sprejemljivo raven spodbudi stohastične procese v populaciji in opraševanje med sorodniki, zato postane genetski zdrs pomembnejši od selekcije. S tega vidika je za oceno genetskega monitoringa izjemno pomembna. Zato ta verifikator velja za ključni verifikator za kazalnik »genetska variabilnost«.

Pri kazalniku »pretok genov–sistemi opraševanja« se vsi verifikatorji obravnavajo samo na napredni ravni. Med njimi velja za najpomembnejšo dejanska stopnja opraševanja med sorodniki. Ta parameter upošteva stopnjo opraševanja med sorodniki ugotovljeno na podlagi analize genetskih markerjev in odstotek polnih semen, ki predstavlja uresničenje potencialnega izroda zaradi opraševanja med sorodniki. Dejanska stopnja opraševanja med sorodniki velja za ključni verifikator za kazalnik »pretok genov–sistemi opraševanja«.

6.5.7 Interpretacija vrednosti: postopen odziv na podlagi sprememb v 10 letih

Genetski monitoring se spoprijema s tremi večjimi omejitvami in izzivi: (a) pomanjkanje zgodovinskih ali izhodiščnih podatkov, (b) uporaba približkov za genetsko raznolikost in (c) odsotnost uveljavljenih protokolov za časovno primerjavo kazalnikov genetskega monitoringa. Posvetili se bomo tretji omejitvi glede na to, da se prvi dve obravnavata že po definiciji: genetski monitoring sam po sebi zbira zgodovinske podatke, poleg tega uporablja dejanske vrednosti za genetsko raznolikost in diferenciacijo, ne pa približkov. S tega vidika genetski monitoring obravnava referenčne točke in jih primerja, ne pa mejnih vrednosti. Referenčne točke so posebne vrednosti merljivih lastnosti bioloških sistemov ter se uporabljajo kot merila za upravljanje gozdnih genskih virov in znanstveno svetovanje, absolutne mejne vrednosti (ali sprožilne točke) pa so natančne referenčne točke, ki sprožajo skrb za ohranjanje gozdnih genskih virov zaradi nesprejemljivega tveganja ali nepopravljive škode (Grant 2007). Določanje mejnih vrednosti je lahko težavno, saj so mejne vrednosti odvisne od posameznega primera in se verjetno razlikujejo med vrstami (Flanagan in sod. 2017, Atkinson in sod. 2004). Zato dajemo prednost statistično značilni in/ali kritični razliki časovnih referenčnih točk, toda upoštevamo, da je taka kritična razlika sama po sebi mejna točka.

Več avtorjev je poudarilo, kako pomembno je pri genetskem monitoringu določiti mejne vrednosti ali vrednosti kritičnih razlik (Aravanopoulos 2011, Bruford in sod. 2017, Namkoong in sod. 2002, Leroy in sod. 2018, Hoban in sod. 2014). Ni neobičajno, da odkrivamo statistično značilne razlike pri različnih populacijah ali jih odkrivamo v istih populacijah v različnih časovnih obdobjih. Pri genetskem monitoringu kot sistemu zgodnjega opozarjanja na genetske spremembe je treba poleg tega, da genetski monitoring ugotavlja statistično značilne razlike pri časovnih primerjavah, upoštevati tudi to, da mora biti obseg teh razlik precejšnji, da vzbudijo skrb. Ta obseg (kritična razlika ali presežanje mejne vrednosti med različnimi časovnimi ocenami) se določi za vsak verifikator na podlagi prejšnjih priporočil, ki večinoma izvirajo iz obstoječe omejene literature, strokovnega mnenja in *ad hoc*

ocen. Metoda ponovnega vzorčenja markerjev z zankanjem (»bootstrapping«), s katero ustvarimo 1000 ponovitev, iz katerih se izračuna interval zaupanja (IZ), je za zdaj najustreznejši način testiranja statistične značilnosti pri primerjavi večine verifikatorjev na podlagi molekularnih podatkov (izvedeno v programu GenAIEx, Peakall in Smouse (2006)).

Literatura v splošnem pozna tri ravni kritične razlike za namene primerjave: (a) statistično značilne razlike (ssd), (b) razlike, ki poleg zgoraj navedenega za $\geq 25\%$ presegajo izhodiščno vrednost, in (c) razlike, ki poleg tega, da so statistično značilne, za $\geq 50\%$ presegajo izhodiščno vrednost (Aravanopoulos 2011, 2016, Boyle 2000, Namkoong in sod. 1996, Namkoong in sod. 2002).

Za večino verifikatorjev je za testiranje statistično značilnih razlik pri vrednostih, pridobljenih z ocenami v več časovnih obdobjih, mogoče uporabiti pristop ANOVA (na primer T-test). Obravnavo nekaterih posebnih verifikatorjev, ki odstopajo od zgoraj omenjenega pristopa, predstavljamo v nadaljevanju.

Potencialno značilne razlike pri verifikatorju »alelne frekvence« lahko testiramo s pripravo kontingenčnih tabel in z izvajanjem ustrezne analize ob uporabi Fisherjevega natančnega testa ali pa χ^2 -testa (oziroma G-testa). Fisherjev test ima prednost, ker je natančna statistika, ki jo je mogoče izvesti usmerjeno, χ^2 -test pa je približna statistika in ga omejuje to, da mora biti pričakovana frekvenca v vsaki celici kontingenčne tabele $\geq 5,0$.

Verifikator »efektivna velikost populacije (N_e)« je izjema k pravilu o uporabi primerjalnih referenčnih točk. V tem primeru je priporočljiva najmanjša mejna (ali sprožilna) vrednost $N_e \geq 500$. Ta vrednost temelji na ponovni oceni študij primerov in simulacij, ki kažejo, da mora biti $N_e \geq 100$, da bi se izguba skupnega fitnesa omejila na $< 10\%$ po petih generacijah, ali bolje $N_e \geq 500$, da bi preprečili genetsko erozijo in ohranili adaptivno genetsko raznolikost (Frankham in sod. 2014, Hoban in sod. 2014, Hoban in sod. 2020, Leroy in sod. 2018, Willoughby in sod. 2017).

Verifikator »vezavno neravnovesje (LD)« je verjetno najtežje ustrezno oceniti. LD je različen pri različnih populacijah, osebkih, kromosomih v osebku in celo različnih regijah na kromosomu (Aravanopoulos 2014, Evans in Cardon 2005, Weiss in Clark 2002). Zato je pomembno, da se časovna primerjava nanaša na iste gene. Uporabljata se dve meri za LD, Pearsonov kvadratni koeficient korelacije r^2 (Hill in Robertson 1968) in standardizirani koeficient vezavnega neravnovesja D' (Lewontin 1964). Njuno značilnost lahko testiramo s testom Spearmanovega koeficienta korelacije (Evans in Cardon 2005).

Rezultate genetskega monitoringa je treba ocenjevati skladno z vnaprej določenimi merili za značilne spremembe (Aravanopoulos 2011, Flanagan in sod. 2017). V splošnem lahko pričakujemo majhne razlike vrednosti parametrov (verifikatorjev) in glede na priporočene velikosti vzorcev bomo zelo verjetno odkrili opazne in morda statistično značilne razlike vsaj pri demografskih parametrih. Biološko interpretacijo in pomen takih razlik je treba določiti zunaj statističnega okvira in ob upoštevanju, da je zaradi njihovega biološkega pomena treba oceniti povezane biološke (genekološke) procese, ki se uporabljajo za ocenjevanje genetskega monitoringa. Spodaj je na voljo shematični prikaz tega, kako oceniti razlike v časovnih ocenah na različnih ravneh.

Preglednica 6.10: Ravni kritične razlike med časovnimi ocenami, ravni odziva in priporočeno ukrepanje. ssd: statistično značilne razlike; IZ: interval zaupanja.

Št.	Raven razlike	Raven odziva	Ukrepanje
1	ssd; zunaj 95 % IZ	1. raven	posvet z gozdarji o stanju na terenu
2	ssd; 25 % razlike od izhodiščne ocene	2. raven	ponovni pregled gozdnogojitvenih načrtov/načrtov za gospodarjenje, spodbujanje naravnega pomlajevanja
3	ssd; 50 % razlike od izhodiščne ocene	3. raven	temeljiti monitoring ploskve, razmisliti o ohranjanju <i>ex situ</i>

Neodvisnosti parametrov ni mogoče v celoti zagotoviti in medsebojni odvisnosti kazalnikov in parametrov se ni mogoče popolnoma izogniti. Očitno se lahko pojavijo okoliščine, v katerih je mogoče dobiti »nasprotujoče si«

rezultate v zvezi s kritičnimi razlikami (Namkoong in sod. 2002, Aravanopoulos 2011). Zato spodaj za vsako raven navajamo minimalno število verifikatorjev, ki kažejo negativna gibanja (na 2. ali 3. ravni razlike), pri katerem je treba korektivno ukrepati:

Osnovna raven: mortaliteta, obilnost naravnega mladja, obrod, cvetenje: trije od štirih morajo kazati negativna gibanja, pod pogojem, da je eden od njih obilnost naravnega mladja.

Standardna raven: štirje verifikatorji z osnovne ravni, poleg tega pa še: alelna frekvenca, alelna bogastvo (SSR), vezavno neravnovesje (SNP), latentni genetski potencial, koeficient opraševanja med sorodniki F_{IS} , efektivna velikost populacije: šest od desetih verifikatorjev mora kazati negativna gibanja, med njimi morata kazati negativna gibanja obilnost naravnega mladja in efektivna velikost populacije.

Napredna raven: 10 verifikatorjev s standardne ravni, poleg tega pa še: pretok genov, multilokusna ocena opraševanja med nesorodnimi osebki, dejanska stopnja opraševanja med sorodniki: osem od trinajstih mora kazati negativna gibanja, med njimi morajo kazati negativna gibanja obilnost naravnega mladja, Ne in dejanska stopnja opraševanja med sorodniki.

Viri

- Adamack AT, Gruber B (2014) PopGenReport: simplifying basic population genetic analyses in R. *Methods Ecol Evol* 5(4):384-387. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12158>
- Adams RP, Zhong M, Fei Y (1999) Preservation of DNA in plant specimens—inactivation and reactivation of DNAses in field specimens. *Mol Ecol* 8:681-683. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1999.84600.x>
- Agapow PM, Burt A (2001) Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Mol Ecol Notes* 1:101-102. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8278.2000.00014.x>
- Akaike H, Pazen E, K Tanabe, Kitagawa G (1998) Selected papers of Hirotugo Akaike. Springer Science & Business Media. <https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1694-0>
- Albrechtsen A, Nielsen FC, Nielsen R (2010) Ascertainment biases in SNP chips affect measures of population divergence. *Mol Biol Evol* 27(11):2534-2547. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq148>
- Alizoti PG, Kilimis K, Gallios P (2010) Temporal and spatial variation of flowering among *Pinus nigra* Arn. clones under changing climatic conditions. *For Ecol Manag* 259:786-797. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2009.06.029>
- Amos W, Hoffman JI, Frodsham A et al (2007) Automated binning of microsatellite alleles: problems and solutions. *Mol Ecol Notes* 7:10-14. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01560.x>
- Antao T, Pérez-Figueroa A, Luikart, G (2011) Early detection of population declines: high power of genetic monitoring using effective population size estimators. *Evol Appl* 4(1):144-154. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2010.00150.x>
- Applied biosystems/Thermo Fisher Scientific (2014) User guide: DNA fragment analysis by capillary electrophoresis, Revision B. Thermo Fisher Scientific Inc., Carlsbad
- Applied biosystems/Thermo Fisher Scientific/Hitachi (2010) Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer User Guide. Thermo Fisher Scientific Inc., Carlsbad
- Apsit VJ, Dyer RJ, Sork VL (2002) Patterns of mating in an insect-pollinated tree species in the Missouri Ozark Forest Ecosystem Project. In: Shifley SR Kabrick, JM, (eds) Proceedings of the Second Missouri Ozark Forest Ecosystem Project Symposium: Post-treatment Results of the Landscape Experiment. Gen. Tech. Rep. NC-227. St. Paul, MN: U.S. Dept. of Agriculture, Forest Service, North Central Forest Experiment Station, pp 212-226
- Aravanopoulos FA (2011) Genetic monitoring in natural perennial plant populations. *Botany* 89(2):75-81. <https://doi.org/10.1139/b10-087>
- Aravanopoulos FA (2014) Genomics of Trees. In: Ramawat KG, Merillon JM, Ahuja MR (eds) Tree Biotechnology. CRC Press, Boca Raton, pp 514-557
- Aravanopoulos FA (2016) Conservation and monitoring of tree genetic resources in temperate forests. *Curr For Rep* 2(2):29-119. <https://doi.org/10.1007/s40725-016-0038-8>
- Aravanopoulos FA, Zsuffa L (1998) Heterozygosity and biomass production in *Salix eriocephala*. *Heredity* 81:396-403. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.1998.00409.x>
- Askew GR, Blush ThD (1990) Short note: An index of phenological overlap in flowering for clonal conifer seed orchards. *Silvae Genet* 39(3-4): 168-171.

- Atkinson AJ, Trenham PC, Fisher RN, Hathaway SA, Johnson BS, Torres SG, Moore YC (2004) Designing monitoring programs in an adaptive management context for regional multiple species conservation plans. U.S. Geological Survey Technical Report, USGS Western Ecological Research Center, Sacramento
- Bada JL, Wang XYS, Hamilton H (1999) Preservation of key biomolecules in the fossil record - current knowledge and future challenges. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 354(1379):77-86. <https://doi.org/10.1098/rstb.1999.0361>
- Baptiste A (2020) GridExtra: Miscellaneous functions for 'grid' graphics. R Package Version 2.3. <http://cran.r-project.org/package=gridExtra>. Accessed 28 October 2020
- Barnett B, Lewis T (1978) *Outliers in statistical data*. Wiley, New York
- Barrett SCH, Yakimowski SB, Field DL, Pickup M (2010) Ecological genetics of sex ratios in plant populations. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 365(1552):2549-2557. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0002>
- Barton NH, Slatkin M (1986) A quasi-equilibrium theory of the distribution of rare alleles in a subdivided population. *Heredity*, 56(3):409. <https://doi.org/10.1038/hdy.1986.63>
- Belletti P, Ferrazzini D, Piotti A, Monteleone I, Ducci F (2012) Genetic variation and divergence in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) within its natural range in Italy. *Eur J Forest Res* 131:1127-1138. <https://doi.org/10.1007/s10342-011-0584-3>
- Benestan L, Gosselin T, Perrier C, Sainte-Marie B, Rochette R, Bernatchez L (2015) RAD genotyping reveals fine-scale genetic structuring and provides powerful population assignment in a widely distributed marine species, the American lobster (*Homarus americanus*). *Mol Ecol* 24 (13):3299-3315. <https://doi.org/10.1111/mec.13245>
- Bengtsson H (2014) MatrixStats: Methods That Apply to Rows and Columns of a Matrix. R Package Version 0.10.1. [rdrr.io. https://rdrr.io/rforge/matrixStats/man/matrixStats-package.html](https://rdrr.io/rforge/matrixStats/man/matrixStats-package.html). Accessed 17 November 2020
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol* 57(1):289-300
- Bergmann F, Gregorius HR, Larsen JB (1990) Levels of genetic variation in European Silver fir (*Abies alba*) - Are They Related to the Species Decline? *Genetica* 82(1):1-10. <https://doi.org/10.1007/BF00057667>
- Beuker E, Raspe S, Bastrup-Birk A, Preuhsler T (2010) Phenological Observations. Manual Part VI. In: Manual on methods and criteria for harmonized sampling, assessment, monitoring and analysis of the effects of air pollution on forests. UNECE, ICP Forests, Hamburg
- Boyle TJ (2000) Criteria and indicators for the conservation of genetic diversity. In: Young A, Boshier T, Boyle T (eds) *Forest conservation genetics*. CSIRO Publ., Collingwood, pp 239-251
- Briggs DEG (1999) Molecular taxonomy of animal and plant cuticles – selective preservation and diagenesis. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 354:7-16. <https://doi.org/10.1098/rstb.1999.0356>
- Brousseau L, Postolache D, Lascoux M, Drouzas A D, Källman T, Leonarduzzi C, Liepelt S, et al (2016) Local adaptation in European Firs assessed through extensive sampling across altitudinal gradients in Southern Europe. *PLoS ONE* 11(7):1-16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158216>
- Brownie J, Shawcross S, Theaker J, Whitcombe D, Ferrie R, Newton C, Little S (1997) The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucleic Acids Res* 25:3235-3241. <https://dx.doi.org/10.1093/nar/25.16.3235>
- Bruford MW, Davies N, Dulloo ME, Faith DP and M Walters (2017) Monitoring changes in genetic diversity. In: Walters M, Scholes RJ (eds) *The GEO handbook on biodiversity observation networks*, Springer Nature, Switzerland, pp 107-128
- Buchan JC, Archie EA, Van Horn RC, Moss CJ, Alberts SC (2005) Locus effects and sources of error in noninvasive genotyping. *Mol Ecol Notes* 5:680-683. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01002.x>
- Buchholz K, Pickering, JL (1978) DBH-distribution analysis: an alternative to stand-age analysis. *Bull Torrey Bot Club* 105(4):1-282. <https://doi.org/10.2307/2484921>
- Burczyk J, DiFazio, SP, Adams WT (2004). Gene flow in forest trees: how far do genes really travel? *Forest Genetics* 11(3-4):179.
- Butler JM (2005a) Constructing STR multiplex assays. In: Carracedo A (ed) *Forensic DNA typing protocols*. Methods in Molecular Biology, Humana Press, pp 53-65.
- Butler JM (2005b) *Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR Markers*. Elsevier Academic Press, London
- Center for Plant Conservation (2020) Guidelines for Tissue Collection and Storage Related to Genetic Studies of Rare Plants. CPC Best Plant Conservation Practices to Support Species Survival in the Wild. <https://plantnucleus.com/best-practices/guidelines-tissue-collection-and-storage-related-genetic-studies-rare-plants>. Accessed 25 November 2020
- Chamberlain JS, Gibbs RA, Rainer JE, Nguyen PN, Thomas C (1988) Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res* 16:11141-11156. <https://dx.doi.org/10.1093/nar/16.23.11141>

- Chambers GK, MacAvoy ES (2000) Microsatellites: consensus and controversy. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 126:455-476. [https://doi.org/10.1016/s0305-0491\(00\)00233-9](https://doi.org/10.1016/s0305-0491(00)00233-9)
- Chapuis M, Lecoq M, Michalakos Y, Loiseau A, Sword GA, Piry S, Estoup A (2008) Do outbreaks affect genetic population structure? A worldwide survey in *Locusta migratoria* a pest plagued by microsatellite null alleles. *Mol Ecol* 17:640-3653. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03869.x>
- Charlesworth B (2009) Effective population size and patterns of molecular evolution and variation. *Nat Rev Genet* 10(3):195-205. <https://doi.org/10.1038/nrg2526>
- Chase M, Hills J (1991) Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon* 40:215-220. <https://doi.org/10.2307/1222975>
- Cipriani G, Marrazzo MT, Di Gaspero G et al (2008) A set of microsatellite markers with long core repeat optimized for grape (*Vitis* spp.) genotyping. *BMC Plant Biol* 8:1-127. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-127>
- Clarke LA, Rebelo CS, Gonçalves J, Boavida MG, Jordan P (2001) PCR amplification introduces errors into mononucleotide and dinucleotide repeat sequences. *Mol Pathol* 54 (5):351-353. <https://doi.org/10.1136/mp.54.5.351>
- Csilléry K, Lagüe H, Vendramin GG, González-Martínez SC, Fady B, Oddou-Muratorio S (2014) Detecting short spatial scale local adaptation and epistatic selection in climate-related candidate genes in European beech (*Fagus sylvatica*) populations. *Mol Ecol* 23(19):4696-4708. <https://doi.org/10.1111/mec.12902>
- Csilléry K, Ovaskainen O, Sperisen C, Buchmann N, Widmer A, Gugerli F (2020) Adaptation to local climate in multi-trait space: evidence from Silver fir (*Abies alba* Mill.) populations across heterogeneous environment. *Heredity* 124(1):77-92. <https://doi.org/10.1038/s41437-019-0240-0>
- Dąbrowski MJ, Bornelöv S, Kruczyk M, Baltzer N, Komorowski J (2015) True null allele detection in microsatellite loci: a comparison of methods, assessment of difficulties and survey of possible improvements. *Mol Ecol Res* 15(3):477-488. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12326>
- Dakin EE, Avise JJ (2004) Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93(5):504-509. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800545>
- De Vitis M, Hay FR, Dickie, JB, Trivedi C, Choi J, Fiegenger R. (2020). Seed storage: maintaining seed viability and vigor for restoration use. *Restor Ecol* 28(S3):S249-S255 <https://doi.org/10.1111/rec.13174>
- Del Castillo RF, Trujillo S (2008) Effect of inbreeding depression on outcrossing rates among populations of a tropical pine. *New Phytol* 177(2):517-524. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02260.x>
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Biol Rep* 1:19-21. <https://doi.org/10.1007/BF02712670>
- Demeke T, Jenkins GR (2010) Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Anal Bioanal Chem Res* 396(6):1977-1990. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3150-9>
- Dewoody J, Nason JD, Hipkins VD (2006) Mitigating scoring errors in microsatellite data from wild populations: Review. *Mol Ecol Notes* 6(4):951-957. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01449.x>
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. *Phyto Bull* 19:11-15.
- Dray S, Dufour AB (2007) The Ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *J Stat Soft* 22(4):1-20. <https://doi.org/10.18637/jss.v022.i04>
- Ducci F, De Cuyper B, Pâques LE, Proietti R, Wolf H (2012) Reference protocols for assessment of trait and reference genotypes to be used as standards in international research projects. CRA SEL-Arezzo, Italy
- Dupuis JR, Jeffrey CO, Brunet BMT, Longcore T, Johnson JJ, Sperling FAH (2018) Genomic data indicate ubiquitous evolutionary distinctiveness among populations of California metalmark butterflies. *Conserv Genet* 19 (5):1097-1108. <https://doi.org/10.1007/s10592-018-1081-8>
- Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskey CT (1991) DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet* 49:746-756.
- Edwards MC, Gibbs RA. 1994. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *PCR Meth Appl* 3:65-75. <https://doi.org/10.1101/gr.3.4.s65>
- Eizaguirre C, Baltazar-Soares M (2014) Evolutionary conservation-evaluating the adaptive potential of species. *Evol Appl* 7(9):963-967. <https://doi.org/10.1111/eva.12227>
- Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE (2000) Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev* 13:559-570. <https://doi.org/10.1128/cmr.13.4.559-570.2000>
- Estoup A, Garnery L, Solignac M, Cornuet JM (1995) Microsatellite variation in honeybee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics*, 140:679-695.

- Estoup A, Wilson IJ, Sullivan C, Cornuet JM, Moritz C (2001) Inferring population history from microsatellite and enzyme data in serially introduced cane toads, *Bufo marinus*. *Genetics* 159(4):1671-1687.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14: 2611-2620. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
- Evans DM, LR Cardon (2005) A comparison of linkage disequilibrium patterns and estimated population recombination rates across multiple populations. *Am J Hum Genet* 76:681-687. <https://doi.org/10.1086/429274>
- Ewen KR, Bahlo M, Treloar SA et al (2000) Identification and analysis of error types in high-throughput genotyping. *Am J Hum Genet* 67:727-736. <https://doi.org/10.1086/303048>
- Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver. 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Res* 10 (3):564-567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Fazekas AJ, Steeves R, Newmaster SG (2010) Improving sequencing quality from PCR products containing long mononucleotide repeats. *BioTechniques* 48:277-281. <https://doi.org/10.2144/000113369>
- Fischer MC, Foll M, Excoffier L, Heckel G (2011) Enhanced AFLP genome scans detect local adaptation in high-altitude populations of a Small rodent (*Microtus arvalis*). *Mol Ecol* 20(7):1450-1462. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05015.x>
- Fisher RA (1930) *The genetical theory of natural selection*, Oxford University Press, London
- Flanagan SP, Forester BR, Latch EK, Aitken SN, Hoban S (2018) Guidelines for planning genomic assessment and monitoring of locally adaptive variation to inform species conservation. *Evol Appl* 11:1035-1052. <https://doi.org/10.1111/eva.12569>
- Flores-Rentería L, Krohn A (2013) Scoring microsatellite loci. *Microsatellites*. In: Kantartzi SK (ed) *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, pp 319-336
- Flores-Rentería L, Whipple AV (2011) A new approach to improve the scoring of mononucleotide microsatellite loci. *Am J Bot* 98 (3):e51-e53. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000428>
- Francis RM (2017) Pophelper: An R package and web app to analyse and visualize population structure. *Mol Ecol Res* 17(1):27-32. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12509>
- Frankham R, Bradshaw CJ, Brook BW (2014) Genetics in conservation management: Revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. *Biol Conserv* 170:56-63. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2013.12.036>
- Funk WC, McKay JK, Hohenlohe PA, Allendorf FW (2012) Harnessing genomics for delineating conservation units. *Trends Ecol Evol* 27(9):489-496. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.05.012>
- Fussi B, Westergren M, Aravanopoulos F, Baier R, Kavaliauskas D, Finžgar D, Alizoti P, Božič G, Avramidou E, Konnerth M, Kraigher H (2016) Forest genetic monitoring: an overview of concepts and definitions. *Environ Monit Assess* 188(8):1-12. <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5489-7>
- Gagneux P, Boesch C, Woodruff DC (1997) Microsatellite scoring errors associated with non-invasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair. *Mol Ecol* 6(9):861-68. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1997.tb00140.x>
- Galan M, Cosson JF, Aulagnier S, Maillard JC, Thévenon S, Hewison AJM (2003) Cross-amplification tests of ungulate primers in roe deer (*Capreolus capreolus*) to develop a multiplex panel of 12 microsatellite loci. *Mol Ecol Notes* 3:142-146. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00384.x>
- Gerard FF, George CT, Hayman G, Chavana-Bryant C, Weedon GP (2020) Leaf phenology amplitude derived from MODIS NDVI and EVI: maps of leaf phenology synchrony for Meso- and South America. *Geosci Data J* 7(1):13-26. <https://doi.org/10.1002/gdj3.87>
- Ghosh S, Karanjawala ZE, Hauser ER et al (1997) Methods for precise sizing, automated binning of alleles, and reduction of error rates in largescale genotyping using fluorescently labelled dinucleotide markers.
- Goudet J (2005) Hierfstat, a package or R to compute and test hierarchical F-statistics. *Mol Ecol Notes* 2:184-186. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00828.x>
- Grant WS (2007) Status and trends in genetic resources of captured fisheries. In: Bartley DM, Harvey BJ, Pullin RSV (eds) *Workshop on status and trends in aquatic genetic resources*. FAO Publ., Rome, pp 29-81
- Gregorius H (1978) The concept of genetic diversity and its formal relationship to heterozygosity and genetic distance. *Math Biosci* 41(3-4):253-71. [https://doi.org/10.1016/0025-5564\(78\)90040-8](https://doi.org/10.1016/0025-5564(78)90040-8)
- Gregorius HR, Krauhausen J, Müller-Starck G (1986) Spatial and temporal genetic differentiation among the seed in a stand of *Fagus sylvatica* L. *Heredity* 57:255-262. <https://doi.org/10.1038/hdy.1986.116>
- Gross A, Holdenrieder O, Pautasso M, Queloz V, Sieber TN (2013) *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the causal agent of European ash dieback. *Mol Plant Pathol* 15(1):5-21. <https://doi.org/10.1111/mpp.12073>
- Gruber B, Unmack PJ, Berry OF, Georges A (2018) Dartr: An R package to facilitate analysis of SNP data generated from reduced representation genome sequencing. *Mol Ecol Res* 18(3):691-699. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12745>

- Guichoux E, Lagache L, Wagner S, Chaumeil P, LéGer P, Lepais O, Lepoittevin C, Malausa T, Revardel E, Salin F et al (2011) Current trends in microsatellite genotyping. *Mol Ecol Res* 11:591-611. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03014.x>
- Gusmão L, Butler JM, Carracedo A et al (2006) DNA commission of the international society of forensic genetics (ISFG): an update of the recommendations on the use of Y-STRs in forensic analysis. *Int J Legal Med* 20:191-200. <https://doi.org/10.1007/s00414-005-0026-1>
- Hahn M, Wilhelm J, Pingoud A (2001) Influence of fluorophore dye labels on the migration behaviour of polymerase chain reaction-amplified short tandem repeats during denaturing capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 22:2691-2700. [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200108\)22:13](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200108)22:13)
- Harper AL, Mckinney LV, Nielsen LR, Havlickova L, Li Y, Trick M, Bancroft I (2016) Molecular markers for tolerance of European ash (*Fraxinus excelsior*) to dieback disease identified using Associative Transcriptomics. *Sci Rep* 6(1):1-7. <https://doi.org/10.1038/srep19335>
- Hartmann C, Lennartz K, Ibrahim H, Coz A, Kasper Y, Lenz C, Mathur D, Polidori M (2016) Application note: stable 16-year storage of DNA purified with the QIAamp® DNA Blood Mini Kit. Qiagen GmbH. <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=705c6944-4633-4101-8500-a6642d253a0e&lang=en> Accessed 1 October 2020
- Hartzell B, Graham K, McCord B (2003) Response of short tandem repeat systems to temperature and sizing methods. *Forensic Sci Int* 133:228-234. [https://doi.org/10.1016/s0379-0738\(03\)00074-4](https://doi.org/10.1016/s0379-0738(03)00074-4)
- Hattermer HH (1991) Genetic variation in European populations of forest trees. In: Müller-Starck G, Ziehe M (eds) J.D. Sauerlander's Verlag, Frankfurt am Main, pp 271
- Hay FR, Smith RD (2003) Seed maturity: when to collect seeds from wild plants. In: Smith RD, Dickie JB, Linington SH, Pritchard HW, Probert RJ (eds) Seed conservation: turning science into practice. The Royal Botanic Gardens Kew, Richmond, pp 97-133
- Heer K, Behringer D, Piermattei A, Bässler C, Brandl R, Fady B, Jehl H, et al (2018) Linking dendroecology and association genetics in natural populations: stress responses archived in tree rings associate with SNP genotypes in Silver fir (*Abies alba* Mill.). *Mol Ecol* 27(6):1428-1438. <https://doi.org/10.1111/mec.14538>
- Hill CR, Butler JM, Vallone PM (2009) A 26plex autosomal STR assay to aid human identity testing. *J Forensic Sci* 54:1008-1015. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2009.01110.x>
- Hill WG (1981) Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. *Genet Res* 38(3):209-216. <https://doi.org/10.1017/S0016672300020553>
- Hill WG, Robertson A (1968) Linkage disequilibrium in finite populations. *Theor Appl Genet* 38:226-231. <https://doi.org/10.1007/BF01245622>
- Hoban S, Arntzen J A, Bruford MW, Godoy JA, Rus Hoelzel A, Segelbacher G, Bertorelle G et al (2014) Comparative evaluation of potential indicators and temporal sampling protocols for monitoring genetic erosion. *Evol Appl* 7:984-998. <https://doi.org/10.1111/eva.12197>
- Hoban S, Bruford M, D'Urban JJ et al (2020): Genetic diversity targets and indicators in the CBD post-2020 Global Biodiversity Framework must be improved. *Biol Conserv* 248:108654. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108654>
- Hoffman JI, Amos W (2005) Microsatellite genotyping errors: detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion. *Mol Ecol* 14(2):599-612. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02419.x>
- Holleley CE, Geerts PG (2009) Multiplex manager 1.0: a cross-platform computer program that plans and optimizes multiplex PCR. *BioTechniques* 46:511-517. <https://doi.org/10.2144/000113156>
- Hothorn T, Frank Bretz, Westfall P (2008) Simultaneous inference in general parametric models. *Biom J* 50(3):346-363. <https://doi.org/10.1002/bimj.200810425>
- Hu G (1993) DNA Polymerase-catalyzed addition of nontemplated extra nucleotides to the 3' of a DNA fragment. *DNA Cell Biol* 12:763-770. <https://doi.org/10.1089/dna.1993.12.763>
- Hubisz MJ, Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Mol Ecol Res* 9(5):1322-1332. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x>
- Campbell LD, Astrin JJ, DeSouza Y, Giri J, Patel AA, Rawley-Payne M, Rush A and Sieffert N (2018) The 2018 Revision of the ISBER Best Practices: Summary of Changes and the Editorial Team's Development Process. *Biopreservation and Biobanking* 16(1): 3-6. <https://doi.org/10.1089/bio.2018.0001>
- Idury RM, Cardon LR (1997) A simple method for automated allele binning in microsatellite markers. *Genome Res* 7:1104-1109. <https://doi.org/10.1101/gr.7.11.1104>
- ISTA (2020) International Rules for Seed Testing. International Seed Testing Assoc., Zurich
- Ivanova N, Kuzmina K (2013) Protocols for dry DNA storage and shipment at room temperature. *Mol Ecol Resour* 13(5):890-898. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12134>

- Jayashree B, Reddy PT, Leeladevi Y, Crouch JH, Mahalakshmi V et al (2006) Laboratory information management software for genotyping workflows: applications in high throughput crop genotyping. *BMC Bioinform* 7:383. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-383>
- Jombart T (2008) Adegenet: an R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24(11):1403-1405. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129>
- Jombart T, Ahmed I (2011) Adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP Data. *Bioinformatics* 27(21):3070-3071. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr521>
- Jombart T, Devillard S, Balloux F (2010) Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genet* 11(94):1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000455>
- Kalinowski ST (2004) Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. *Conserv Genet* 5(4):539-43. <https://doi.org/10.1023/B:COGE.0000041021.91777.1a>
- Kalinowski ST, Taper ML (2006) Maximum likelihood estimation of the frequency of null alleles at microsatellite loci. *Conserv Genet* 7(6):991-995. <https://doi.org/10.1007/s10592-006-9134-9>
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecol* 16: 1099-1106. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x>
- Kamvar ZN, Tabima JF, Grünwald NJ (2014) Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ* 2:e281. <https://doi.org/10.7717/peerj.281>
- Kimura M (1983) *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press, Cambridge. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511623486>
- King EP (1953) On some procedures for the rejection of suspected data. *J Am Stat Assoc* 48(263):531-533. <https://doi.org/10.1080/01621459.1953.10483490>
- Kirov G, Williams N, Sham P, Craddock N, Owen MJ (2000) Pooled genotyping of microsatellite markers in parent-offspring trios. *Genome Res* 10:105-115. <https://doi.org/10.1101/gr.10.1.105>
- Kline MC, Duewer DL, Redman JW, Butler JM (2005) Results from the NIST 2004 DNA quantitation study. *J Forensic Sci* 50:571-578.
- Koetsier G, Cantor E (2019) Technical note: A practical guide to analysing nucleic acid concentration and purity with microvolume spectrophotometers. New England Biolabs Inc. https://www.neb.com/-/media/catalog/application-notes/mvs_analysis_of_na_concentration_and_purity.pdf?rev=be7c8e19f4d34e558527496ea51623dc. Accessed 19th October 2020
- Kudo G (2006) Flowering phenologies of animal-pollinated plants: reproductive strategies and agents of selection. In: Harder LD, Barrett SCH (eds) *Ecology and evolution of flowers*. Oxford Univ. Press, New York, pp 139-158
- Lederer T, Seidl S, Graham B, Betz P (2000) A new pentaplex PCR system for forensic casework analysis. *Int J Legal Med* 114:87-92. <https://doi.org/10.1007/s004140000161>
- Leroy G, Carroll EL, Bruford MW, DeWoody A, Strand A, Waits L, Wang J (2018) Next-generation metrics for monitoring genetic erosion within populations of conservation concern. *Evol Appl* 11:1066-1083. <https://doi.org/10.1111/eva.12564>
- Levinson G, Gutman GA (1987) Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol* 4:203-221. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040442>
- Lewontin RC (1964) The interaction of selection and linkage. I. General considerations; heterotic models. *Genetics* 49:49-67.
- Lewontin RC, Krakauer J (1973) Distribution of gene frequency as a test of the theory of the selective neutrality of polymorphisms. *Genetics* 74(1):175-195.
- Lim PO, Kim HJ, Nam HG (2007) Leaf senescence. *Annu Rev Plant Biol* 58(1):115-136. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105316>
- Linkosalo T, Hakkinen R, Hari P (1996) Improving the reliability of a combined phenological time series by analyzing observation quality. *Tree Physiol* 16(7):661-664. <https://doi.org/10.1093/treephys/16.7.661>
- Livingstone D, Freeman B, Tondo CL, Cariaga KA, Oleas NH, Meerow AW, Schnell RJ, Kuhn DN (2009) Improvement of high-throughput genotype analysis after implementation of a dual-curve Sybr Green I-based quantification and normalization procedure. *HortScience* 44:1228-1232. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.44.5.1228>
- Lloyd DG (1974) Theoretical sex ratios of dioecious and gynodioecious angiosperms. *Heredity* 32(1):11-34. <https://doi.org/10.1038/hdy.1974.2>
- Lowry DB, Hoban S, Kelley JL, Lotterhos KE, Reed LK, Antolin MF, Storer A (2017) Breaking RAD: An evaluation of the utility of restriction site-associated DNA sequencing for genome scans of adaptation. *Mol Ecol Res* 17(2):142-52. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12635>

- Meldgaard M, Morling N (1997) Detection and quantitative characterization of artificial extra peaks following polymerase chain reaction amplification of 14 short tandem repeat systems used in forensic investigations. *Electrophoresis* 18:1928-1935. <https://doi.org/10.1002/elps.1150181107>
- Menkis A, Bakys R, Åslund MS, Davydenko K, Elfstrand M, Stenlid J, Vasaitis R (2019) Identifying *Fraxinus excelsior* tolerant to ash dieback: Visual field monitoring versus a molecular marker. *For Pathol* 50(1), e12572. <https://doi.org/10.1111/efp.12572>
- Morin PA, Martien KK, Archer FI et al (2010) Applied conservation genetics and the need for quality control and reporting of genetic data used in fisheries and wildlife management. *Heredity* 101:1–10. <https://doi.org/10.1093/jhered/esp107>
- Muller-Landau HC, Condit RS, Chave J, Thomas SC, Bohlman SA, Bunyavejchewin S, Ashton, P et al (2006) Testing metabolic ecology theory for allometric scaling of tree size, growth, and mortality in tropical forests. *Ecol Lett* 9(5):575-588. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00904.x>
- Müller-Starck G (1989). Genetic Implications of Environmental Stress in Adult Forest Stands of *Fagus Sylvatica* L. In Genetic Effects of Air Pollutants. In: Scholz G, Gregorius HR, Rudin D (eds) *Forest Tree Populations*. Springer, Berlin, pp 128-142
- Mund M, Kutsch WL, Wirth C, Kahl T, Knohl A, Skomarkova MV, Schulze ED (2010) The influence of climate and fructification on the inter-annual variability of stem growth and net primary productivity in an old-growth, mixed beech forest. *Tree Physiol* 30:689-704. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpq027>
- Müller-Starck G (1995) Genetic variation in high elevated populations of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.) in Switzerland. *Silvae Genet* 44:5-6.
- Munguía-Rosas MA, Ollerton J, Parra-Tabla V, De-Nova JA (2011) Meta-analysis of phenotypic selection on flowering phenology suggests that early flowering plants are favoured. *Ecol Lett* 14(5):511-521. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2011.01601.x>
- Namkoong G, Boyle T, El-Kassaby YA, Palmberg-Lerche C, Eriksson G, Gregorius HR, Joly H, Kremer A, Savolainen O, Wickneswari R, Young A, Zeh-Nlo M, Prabhu R (2002) Criteria and indicators for sustainable forest management: assessment and monitoring of genetic variation. *Forest Resources Div. FAO, Rome*
- Namkoong G, Boyle T, Gregorius HR, Joly H, Savolainen O, Ratman W, Young A (1996) Testing criteria and indicators for assessing the sustainability of forest management: genetic criteria and indicators. *Centre for International Forestry Research (CIFOR), Bogor*
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:3321-3323. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.12.3321>
- Nei M, Maruyama T, Chakraborty R (1975) The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* 29(1): 1-10. <https://doi.org/10.2307/2407137>
- Neubig KM, Whitten WM, Abbott JR, Elliott S, Soltis DE, Soltis PS (2014) Variables affecting DNA preservation in archival plant specimens. In: Applequist WL, Campbell LM (eds) *DNA banking for the 21st century: proceedings of the US workshop on DNA banking*. William L. Brown Center at the Missouri Botanical garden, St. Louis, Missouri, pp 81-112
- Nielsen EE, Bach LA, Kotlicki P (2006) Hybridlab (Version 1.0): A program for generating simulated hybrids from population samples. *Mol Ecol Notes* 6(4):971-973. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01433.x>
- Nishiguchi MK, Doukakis P, Egan M, Kizirian D, Phillips A, Prendini L, Rosenbaum HC, Torres E, Wyner Y, DeSalle R, Giribet G (2002) DNA isolation procedures. In: DeSalle R, Giribet G, Wheeler W (eds) *Methods and tools in biosciences and medicine – Techniques in molecular systematics and evolution*. Birkhäuser Verlag / Springer Basel AG, Basel, pp 249-287
- Nunziata SO, Scott DE, Lance SL (2015) Temporal genetic and demographic monitoring of pond-breeding amphibians in three contrasting population systems. *Conserv Genet* 16:1335-1344. <https://doi.org/10.1007/s10592-015-0743-z>
- O'Connell LM, Mosseler A, Rajora OP (2006) Impacts of forest fragmentation on the mating system and genetic diversity of white spruce (*Picea glauca*) at the landscape level. *Heredity* 97 (6): 418–426. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800886>.
- Oddou-Muratorio S, Vendramin GG, Buiteveld J, Fady B (2009) Population estimators or progeny Tests: what is the best method to assess null allele frequencies at SSR loci? *Conserv Genet* 10(5):1343-1347. <https://doi.org/10.1007/s10592-008-9648-4>
- Olejniczak M, Krzyzosiak WJ (2006) Genotyping of simple sequence repeats factors implicated in shadow band generation revisited. *Electrophoresis* 27:3724-3734. <https://doi.org/10.1002/elps.200600136>
- Otárola MF, Sazima M, Solferini VN (2013) Tree size and its relationship with flowering phenology and reproductive output in Wild Nutmeg trees. *Ecol Evol* 3(10):3536-3550 <https://doi.org/10.1002/ece3.742>
- Paradis E (2010) Pegas: an R package for population genetics with an integrated-modular approach. *Bioinformatics* 26(3):419-420. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp696>.

- Peakall R, Smouse PE (2006) Genalex 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6(1):288-295 <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>.
- Pedrini S, Gibson-Roy P, Trivedi C, Gálvez-Ramírez C, Hardwick K, Shaw N, Frischie S, Laverack G, Dixon K (2020) Collection and production of native seeds for ecological restoration. *Restor Ecol* 28:S227-S237. <https://doi.org/10.1111/rec.13190>
- Petit RJ, El Mousadik A, Pons O (2008) Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conserv Biol* 12(4):844-855. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.1998.96489.x>
- Pluess AR, Frank A, Heiri C, Lalagüe H, Vendramin GG, Oddou-Muratorio S (2016) Genome–environment association study suggests local adaptation to climate at the regional scale in *Fagus sylvatica*. *New Phytol* 210 (2):589-601. <https://doi.org/10.1111/nph.13809>
- Pohlert T (2020) Calculate pairwise multiple comparisons of mean rank sums extended. R package version 1.7.0. PMCMRplus. <https://CRAN.R-project.org/package=PMCMRplus>. Accessed 30 October 2020
- Porcher E, Lande R (2016) Inbreeding depression under mixed outcrossing, self-fertilization and sib-mating. *BMC Evol Biol* 16(1):105. <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0668-2>
- Prendini L, Hanner R, DeSalle R (2002) Obtaining, storing, and archiving specimens and tissue samples for use in molecular studies. In: DeSalle R, Giribet G, Wheeler W (eds) *Methods and tools in biosciences and medicine – Techniques in molecular systematics and evolution*. Birkhäuser Verlag / Springer Basel AG, Basel, pp 176-248.
- Pritchard, JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959. <https://doi.org/10.1007/s10681-008-9788-0>
- Qiagen (2010) Multiplex PCR Kit Handbook. <https://www.qiagen.com/si/resources/download.aspx?id=a541a49c-cd06-40ca-b1d2-563d0324ad6c&lang=en>. Accessed 10 October 2020
- R Core Team (2020) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>. Accessed 28 October 2020
- Rajora OP, Mosseler A, Major JE (2000a) Indicators of population viability in red spruce, *Picea rubens*. II. Genetic diversity, population structure, and mating behavior. *Can J Bot* 78:941–956. <https://doi.org/10.1139/b00-066>
- Rajora OP, Rahman MH, Buchert GP, Dancik BP (2000b) Microsatellite DNA analysis of genetic effects of harvesting in old-growth eastern white pine (*Pinus strobus*) in Ontario, Canada. *Mol Ecol* 9(3):339-348. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2000.00886.x>
- Rajora OP, Pluhar SA (2003) Genetic diversity impacts of forest fires, forest harvesting, and alternative reforestation practices in black spruce (*Picea mariana*). *Theor Appl Genet* 106(7):1203–1212. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-1169-9>
- Renshaw MA, Saillant E, Bradfield SC, Gold JR (2006) Microsatellite multiplex panels for genetic studies of three species of marine fishes: red drum (*Sciaenops ocellatus*), red snapper (*Lutjanus campechanus*), and cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture* 253:731-735. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.09.012>
- Rice WR (1989) Analyzing table of statistical tests. *Evolution* 43(1):223-225. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1989.tb04220.x>
- Rithidech K, Dunn JJ (2003) Combining multiplex and touchdown PCR for microsatellite analysis. *Methods Mol Biol* 226:295–300. <https://doi.org/10.1385/1-59259-384-4:295>
- Ritland K (1989) Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*. *Evolution* 43(4):848-859. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1989.tb05182.x>
- Ritland K (2002) Extensions of models for the estimation of mating systems using an independent loci. *Heredity* 88:221-228. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800029>
- Ritland K, Jain S (1981) A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using an independent loci. *Heredity* 47(1):35-52. <https://doi.org/10.1038/hdy.1981.57>
- Roesti M, Salzburger W, and Berner D (2012) Uninformative polymorphisms bias genome scans for signatures of selection. *BMC Evol Biol* 12(1):94. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-94>
- Roschanski AM, Csilléry K, Liepelt S, Oddou-Muratorio S, Ziegenhagen B, Huard F, Ullrich KK, Postolache D, Vendramin GG, Fady B (2016) Evidence of divergent selection for drought and cold tolerance at landscape and local scales in *Abies alba* Mill. In the French Mediterranean Alps. *Mol Ecol* 25(3):776-794. <https://doi.org/10.1111/mec.13516>
- Rousset F (2008) Genepop'007: A complete re-implementation of the Genepop Software for Windows and Linux. *Mol Ecol Res* 8(1):103–106. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x>
- Rousset F (2017) Genepop version 4.6. 9. Semantic Scholar. <https://www.semanticscholar.org/paper/Genepop-version-4.6.9-Rousset/88ae28e934a876a0fd981468cfe8d0517b40714b>. Accessed 30 October 2020
- Scandura M, Capitani C, Iacolina L, Marco A (2006) An empirical approach for reliable microsatellite genotyping of wolf DNA from multiple non-invasive sources. *Conserv Genet* 7:813-823. <https://doi.org/10.1007/s10592-005-9106-5>

- Schaber J, Badeck, FW (2002) Evaluation of methods for the combination of phenological time series and outlier detection. *Tree Physiol* 22(14):973-982. <https://doi.org/10.1093/treephys/22.14.973>
- Schuster D, Appleby D (1983) Does freezing and thawing of DNA solutions insert nicks in the double helix. *Focus* 5(2):1. <https://doi.org/10.1.1.713.3395>
- Schwarz G (1978) Estimating the dimension of a model. *Ann Stat* 6(2):462-464.
- Seifert T, Müller-Starck G (2009) Impacts of fructification on biomass production and correlated genetic effects in Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.). *Eur J For Res* 128:155. <https://doi.org/10.1007/s10342-008-0219-5>
- Selkoe KA, Toonen RJ (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol Lett* 9(5):615-629. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00889.x>
- Semagn K, Babu R, Hearne S, Olsen M (2014) Single nucleotide polymorphism genotyping using kompetitive allele specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement. *Mol Breed* 33(1):1-14. <https://doi.org/10.1007/s11032-013-9917-x>
- Sgueglia J, Geiger S, Davis J (2003) Precision studies using the ABI Prism 3100 Genetic Analyzer for forensic DNA analysis. *Anal Bioanal Chem* 376:1247-1254. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-1998-7>
- Signorell A (2020) Tools for Descriptive Statistics. DescTools. <https://cran.r-project.org/package=DescTools>. Accessed 30 October 2020
- Slatkin M (1985) Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution* 39(1):53-65. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb04079.x>
- Slatkin M (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236(4803):787-792. <https://doi.org/10.1126/science.3576198>
- Slatkin M, Barton NH (1989) A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43(7):1349-1368. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1989.tb02587.x>
- Slatkin, M (2008) Linkage disequilibrium: understanding the genetic past and mapping the medical future. *Nat Rev Genet* 9(6):477-485. <https://doi.org/10.1038/nrg2361>
- Smouse PE, Sork VL (2004) Measuring pollen flow in forest trees: a comparison of alternative approaches. *Forest Ecol Manage* 197:21-38. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2004.05.049>
- Soltis PS, Soltis DE (1993) Ancient DNA. Prospects and limitations. *N Z J Bot* 31:203-209. <https://doi.org/10.1080/0028825X.1993.10419497>
- Sork VL, Nason J, Campbell DR, Fernández, J F (1999) Landscape approaches to the study of gene flow in plants. *Trends in Ecol Evol* 14(6):219-224. [https://doi.org/10.1016/s0169-5347\(98\)01585-7](https://doi.org/10.1016/s0169-5347(98)01585-7)
- Sork VL, Smouse PE (2006) Genetic analysis of landscape connectivity in tree populations. *Landscape Ecol* 21(6):821-836. <https://doi.org/10.1007/s10980-005-5415-9>
- Stocks JJ, Metheringham CL, Plumb WJ, Lee SJ, Kelly LJ, Nichols RA, Buggs, RJA (2019) Genomic basis of European ash tree resistance to ash dieback fungus. *Nat Ecol Evol* 3(12):1686-1696. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-1036-6>
- Summers K, Amos W (1997) Behavioral, ecological, and molecular genetic analyses of reproductive strategies in the Amazonian Dart-Poison Frog, *Dendrobates ventrimaculatus*. *Behav Ecol* 8(3):260-267. <https://doi.org/10.1093/beheco/8.3.260>
- Sytsma KJ, Schaal BA (1985) Genetic variation, differentiation, and evolution in a species complex of tropical shrubs based on isozymic data. *Evolution* 39:582-593. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00396.x>
- Taberlet P, Griffon S, Goossens B, Questiau S, Manceau V, Escaravage N, Waits LP, Bouvet J (1996) Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Res* 24(16):3189-3194. <https://doi.org/10.1093/nar/24.16.3189>
- Thomas WK, Paabo S (1994) DNA sequences from old tissue remains. In: Zimmer EA, White TJ, Cann RL, Wilson AC (eds) *Methods in Enzymology. Molecular Evolution: Producing the Biochemical Data*. Academic Press, San Diego, pp 406-419.
- Tyrmi JS, Vuosku J, Acosta JJ, Li Z, Sterck L, Cervera MT, Savolainen O, Pyhäjärvi T (2020) Genomics of clinal local adaptation in *Pinus sylvestris* under continuous environmental and spatial genetic setting. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 10(8):2683-2696. <https://doi.org/10.1534/g3.120.401285>
- Urbanek S, Horner J (2020) Cairo: R graphics device using cairo graphics library for creating high-quality bitmap (PNG, JPEG, TIFF), vector (PDF, SVG, PostScript) and display (X11 and Win32) output. R Package Version 1.5-12.2. <https://CRAN.R-Project.org/Package=Cairo>. Accessed 28 October 2020
- Urquhart A, Kimpton CP, Downes TJ, Gill P (1994) Variation in Short Tandem Repeat sequences—a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. *International Journal of Legal Medicine* 107:13-20. <https://doi.org/10.1007/BF01247268>

- Vallone PM, Butler JM (2004) AutoDimer: a screening tool for primer dimer and hairpin structures. *BioTechniques* 37:226-231. <https://doi.org/10.2144/04372ST03>
- Vallone PM, Hill CR, Butler JM (2008) Demonstration of rapid multiplex PCR amplification involving 16 genetic loci. *Forensic Sci Int Genet* 3:42-45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2008.09.005>
- van Asch B, Pinheiro R, Pereira R et al (2010) A framework for the development of STR genotyping in domestic animal species: characterization and population study of 12 canine X-chromosome loci. *Electrophoresis* 31:303-308. <https://doi.org/10.1002/elps.200900389>
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DP, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4(3):535-538. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>
- Walters C, Reilley AA, Reeves PA, Baszczak J, Richards CM (2006) The utility of aged seeds in DNA banks. *Seed Sci Res* 16(3):169. <https://doi.org/10.1079/SSR2006246>
- Waples RS, Do C (2010) Linkage disequilibrium estimates of contemporary N_e using highly variable genetic markers: a largely untapped resource for applied conservation and evolution. *Evol Appl* 3(3):244-262.
- Weeks DE, Conley YP, Ferrell RE, Mah TS, Gorin MB (2002) A tale of two genotypes: consistency between two high-throughput genotyping centers. *Genome Res* 12:430-435. <https://dx.doi.org/10.1101/gr.211502>
- Weir BS (1979) Inferences about linkage disequilibrium. *Biometric* 35(1):235-254. <https://doi.org/10.2307/2529947>
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38(6):1358-1370. <https://doi.org/10.2307/2408641>
- Weiss KM, Clark AG (2002) Linkage disequilibrium and the mapping of complex human traits. *Trends Genet* 18:19-24. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(01\)02550-1](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(01)02550-1)
- Whitlock MC, Lotterhos KE (2015) Reliable detection of loci responsible for local adaptation: Inference of a null model through trimming the distribution of FST. *Am Nat* 186:S24-S36. <https://doi.org/10.1086/682949>
- Whittaker, JC, Harbord RM, Boxall N, Mackay I, Dawson G, Sibly RM (2003) Likelihood-based estimation of microsatellite mutation rates. *Genetics* 164(2):781-787.
- Wickham H (2016) *Ggplot2: Elegant graphics for data analysis*. Springer-Verlag, New York
- Wickham H, François R, Henry L, Müller K (2020) *Dplyr: A grammar of data manipulation*. Cran. <https://CRAN.R-project.org/package=dplyr>. Accessed 29 October 2020
- Wickham H, Henry L (2020) *Tidyr: Easily tidy data with 'spread' and 'gather' functions*. Cran. <https://cran.r-project.org/web/packages/tidyr/index.html>. Accessed 28 October 2020
- Wickneswari R, Ho WS, Lee KS, Lee CT (2004) Impact of disturbance on population and genetic structure of tropical forest trees. *For Genet* 11(3-4):193-201.
- Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* 22:474-481. <https://doi.org/10.2144/97223st01>
- Willoughby JR, Ivy, JA, Lacy RC, Doyle JM, DeWoody JA (2017) Inbreeding and selection shape genomic diversity in captive populations: Implications for the conservation of endangered species. *PLoS ONE* 12(4):e0175996. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175996>
- Winter DJ (2012) MMOD: an R library for the calculation of population differentiation statistics. *Molecular Ecology Resources* 12(6):1158-1160. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2012.03174.x>
- Wright S (1931) *Evolution in Mendelian populations*. University of Chicago Press, Chicago
- Wright S (1938) Size of population and breeding structure in relation to evolution. *Science* 87:430-431. <https://www.jstor.org/stable/2457575>
- Wright S (1969) *Evolution and the genetics of populations: The theory of gene frequencies*. The University of Chicago Press, Chicago
- Xie, Y (2020) *Knitr: A General-Purpose Package for Dynamic Report Generation in R*. R Package Version 1.28. Cran. <https://cran.r-project.org/web/packages/knitr/index.html>. Accessed 28 October 2020
- Yagi N, Satonaka K, Horio M, Shimogaki H et al (1996) The role of DNase and EDTA on DNA degradation in formaldehyde fixed tissues. *Biotech Histochem* 71:123-129. <https://doi.org/10.3109/10520299609117148>
- Yamamichi M, Innan H (2012) Estimating the migration rate from genetic variation data. *Heredity* 108(4):362-363. <https://doi.org/10.1038/hdy.2011.83>
- Ziemann M, Eren Y, El-Osta A (2016) Gene name errors are widespread in the scientific literature. *Genome Biol* 17:177. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1044-7>



Priročnik za gozdni genetski monitoring

poglavje 7

Ocena stroškov

Marko BAJC¹, Filippos A. ARAVANOPOULOS³, Darius KAVALIAUSKAS²,
Marjana WESTERGREN¹, Fotios KIOURTSIS⁴, Evangelia AVRAMIDOU^{3,6},
Pavlos BEKIAROGLOU⁴, Pavlos CHASILIDIS⁴, Rok DAMJANIĆ¹, Natalija DOVČ¹,
Domen FINŽGAR^{1,5}, Barbara FUSSI², Ermioni MALLIAROU³, Georgios ROUSAKIS⁴,
Chryse SARVANI⁴, Hojka KRAIGHER¹

Citiranje: Bajc in sod. (2020) Ocena stroškov. V: Bajc in sod. (ur) Priročnik za gozdni genetski monitoring. Gozdarski inštitut Slovenije: Založba *Silva Slovenica*, Ljubljana, str 133–148.
<http://dx.doi.org/10.20315/SFS.168>

Povezane ustanove:

1. Gozdarski inštitut Slovenije (GIS), Slovenija
2. Bavarski urad za gozdno genetiko (AWG), Nemčija
3. Aristotelova univerza v Solunu (AUTh), Grčija
4. Decentralizirana uprava Makedonije in Trakije, Generalni direktorat za gozdarstvo in podeželje, Grčija
5. Inštitut za evolucijsko biologijo, Univerza v Edinburgu, Združeno kraljestvo
6. Inštitut za sredozemske gozdne ekosisteme, DEMETER, Grčija

7.1 Uvod

Namen tega dokumenta je predstaviti stroške, povezane z izvedbo gozdnega genetskega monitoringa. Ocena stroškov, predstavljena v tem dokumentu, temelji na dejanskih stroških dejavnosti, izvedenih v okviru projekta LIFEGENMON. Vsaka sodelujoča partnerska ustanova je zabeležila svoje stroške, vključno s stroški materiala, storitev pri zunanjih izvajalcih, potnimi stroški in stroški dela v celotnem trajanju projekta. Stroški so bili razdeljeni na tri osnovne kategorije: 1) stroški materiala, 2) stroški dela (dejanskega dela) in 3) potni stroški. Ker se lahko urne postavke za iste kategorije osebja močno razlikujejo med državami, so stroški dela predstavljeni v obliki števila delovnih ur na kategorijo osebja in kot dejanski stroški dela. Stroški so bili ocenjeni na vrsto/državo/raven monitoringa/kazalnik/verifikator.

7.2 Ocena stroškov

7.2.1 Predpostavke pri oceni stroškov

Ker so stroški izvedbe gozdnega genetskega monitoringa odvisni od številnih različnih dejavnikov, vključno z biologijo opazovanih drevesnih vrst in oddaljenostjo od ploskev, smo v predstavljenih izračunih v okviru ocene stroškov upoštevali nekatere predpostavke, da bi bili rezultati čim bolj primerljivi med državami:

1. Stroški so bili izračunani za desetletno obdobje monitoringa.
2. Obe ocenjeni vrsti, navadna bukev (*Fagus sylvatica* L.) in bela jelka/borisova jelka (*Abies alba* Mill./*Abies borisii-regis* Mattf.), sta sestojni vrsti. Za manjšinske vrste se pričakuje, da bo vse delo, izvedeno na terenu, neizogibno zahtevalo več delovnih ur.
3. Stroški vključujejo DDV (Nemčija 19 %, Grčija 24 %, Slovenija 22 %).
4. Stroški so predstavljeni za optimizirane dejavnosti, ki jih rutinsko izvede v celoti usposobljeno in izkušeno osebje; treba je opozoriti, da je treba pri uvajanju novih metod ali pristopov upoštevati, da lahko v fazi vzpostavitve in optimizacije procesa nastanejo dodatni *začetni* stroški.
5. **Izbira ploskve:** za postopek izbire ploskve je bilo upoštevanih pet (5) obiskov ploskev, ki se ocenjujejo, s povprečno oddaljenostjo 100 km od ustanove do ploskve.
6. **Stroški materiala:** v izračunih so bili uporabljeni dejanski stroški materiala in storitev pri zunanjih izvajalcih, ki so jih sporočili partnerji projekta LIFEGENMON.
7. **Stroški dela:** v izračunih so bile uporabljene povprečne brutourne postavke za posamezne kategorije osebja na državo.
8. **Potni stroški:** izračunani so bili za razdaljo 100 km od ustanove do ploskve za vse države in drevesni vrsti. Čas vožnje je bil izračunan ob uporabi povprečne hitrosti vožnje do ploskev za gozdni genetski monitoring v projektu LIFEGENMON za posamezno državo.
9. **Vzpostavitev ploskve:** v času izvajanja projekta LIFEGENMON je bilo uvedenih več izboljšav prvotnega sistema gozdnega genetskega monitoringa: 1) načrt ploskve za gozdni genetski monitoring je bil spremenjen, tako da vključuje naključno izbiro lokacije ploskve znotraj opazovanega sestaja in naključno izbiro posameznih dreves znotraj ploskve, kadar je to mogoče; 2) število vzorcev je bilo zmanjšano z 250 odraslih dreves na 50 in z 200 osebkov naravnega mladja na 50 kot rezultat analize najmanjšega potrebnega števila vzorcev za oceno molekularnogenetskih verifikatorjev, ki smo jo izvedli za podatke prve ocene gozdnega genetskega monitoringa. Poleg tega smo število ploskev mladja, ki jih je treba vzpostaviti znotraj ploskve za gozdni genetski monitoring, povečali s štiri na dvajset (za podrobnosti glej 3. poglavje: Vzpostavitev in vzdrževanje ploskve). Izboljšani načrt ploskve je bil preizkušen samo v Sloveniji, vse stroške, na katere vplivata sprememba

načrta ploskve in zmanjšano število vzorcev, pa smo izračunali tako, da smo le-te pri vseh partnerjih pomnožili z istim faktorjem pretvorbe, določenim s primerjavo stroškov izboljšanega načrta ploskve s stroški prvotnega načrta ploskve v Sloveniji.

10. **Terenska opazovanja in meritve:**

Število obiskov, potrebnih za popis terenskih opazovanj, ki so bili uporabljeni za izračun stroškov, *temelji na popisanih povprečjih v vseh treh državah, ki sodelujejo v projektu LIFE GENMON. Dejansko število obiskov bo odvisno od opazovanih vrst in lokalnih okoljskih razmer.*

- a. **Mortaliteta/preživetje:** ena (1) ocena vseh 50 opazovanih dreves na obdobje monitoringa za vse ravni.
- b. **Olistanje:**
 - osnovna raven: se ne ocenjuje;
 - standardna raven: dve (2) oceni na obdobje monitoringa, šest (6) opazovanj na oceno;
 - napredna raven: deset (10) ocen na obdobje monitoringa, šest (6) opazovanj na oceno.
- c. **Cvetenje:**
 - osnovna raven: deset (10) ocen na ravni sestoja na obdobje monitoringa, eno (1) opazovanje na oceno;
 - standardna in napredna raven: dve (2) oceni na ravni posameznega drevesa na obdobje monitoringa, dve (2) opazovanji na oceno.
- d. **Obrod:**
 - osnovna raven: deset (10) ocen na ravni sestoja na obdobje monitoringa, eno (1) opazovanje na oceno;
 - standardna in napredna raven: dve (2) oceni na ravni posameznega drevesa na obdobje monitoringa, eno (1) opazovanje na oceno.
- e. **Obilnost mladja:**
 - osnovna raven: deset (10) ocen na ravni sestoja na obdobje monitoringa, eno (1) opazovanje na oceno;
 - standardna raven: tri (3) ocene na podploskvah mladja na obdobje monitoringa, eno (1) opazovanje na oceno;
 - napredna raven: tri (3) ocene na podploskvah naravnega mladja v prvem obdobju monitoringa, šest (6) ocen na podploskvah naravnega mladja v naslednjih obdobjih monitoringa, eno (1) opazovanje na oceno.
- f. **Senescenca:**
 - osnovna raven: se ne ocenjuje;
 - standardna raven: dve (2) oceni na obdobje monitoringa, dve (2) opazovanji na oceno;
 - napredna raven: deset (10) ocen na obdobje monitoringa, dve (2) opazovanji na oceno.
- g. **Porazdelitev debelinskih razredov:**
 - osnovna raven: se ne ocenjuje;
 - standardna in napredna raven: ena (1) ocena vseh 50 opazovanih odraslih dreves na obdobje monitoringa za vse ravni, eno (1) opazovanje na oceno.
- h. **Porazdelitev višinskih razredov:**
 - osnovna raven: se ne ocenjuje;
 - standardna in napredna raven: ena (1) ocena vseh 50 opazovanih odraslih dreves na obdobje monitoringa za vse ravni, eno (1) opazovanje na oceno.

- i. V Grčiji so bila terenska opazovanja (fenološka opazovanja in vrednotenje) izvedena s pomočjo fotodokumentiranja v visoki ločljivosti in posnetki z drona, ki jim je sledila analiza digitalnih fotografij. Čeprav ta pristop omogoča popolno dokumentiranje in preverjanje opazovanj, se je izkazalo, da je občutno zamudnejši in zahteva več dela v primerjavi z vizualnim opazovanjem, zato ni priporočljivo, da bi se pri gozdnem genetskem monitoringu tak pristop uporabljal kot osnovni.

11. Vzorčenje za laboratorijske analize:

a. Odrasla drevesa:

osnovna raven: se ne izvaja;

standardna in napredna raven: eno (1) vzorčenje vseh 50 opazovanih odraslih dreves samo v prvem obdobju gozdnega genetskega monitoringa.

b. Mladje:

osnovna raven: se ne izvaja;

standardna in napredna raven: eno (1) vzorčenje 50 osebkov mladja za vsak ocenjeni obrod na obdobje monitoringa, ki običajno ustreza dvema obiskoma za vzorčenje in 100 vzorcem naravnega mladja na obdobje monitoringa.

c. Seme:

osnovna in standardna raven: se ne izvaja;

napredna raven: vzorčenje semena 20 dreves, naključno izbranih izmed vseh 50 opazovanih odraslih dreves za vsak ocenjeni obrod na obdobje monitoringa, ki običajno ustreza dvema (2) vzorčenjema na obdobje monitoringa.

12. **Laboratorijske analize:** Za izračun stroškov genotipizacije je bila upoštevana samo analiza mikrosatelitnih markerjev (SSR). V projektu LIFE GENMON so bili analizirani tudi markerji SNP, vendar samo za podnabor vzorcev iz prvega obdobja ocenjevanja, zato vseh primerjalnih analiz ni bilo mogoče izvesti s podatki SNP. Poleg tega je bilo analizirano različno število SNP in vzorcev za posamezno opazovano vrsto, zato bi bila primerjava stroškov manj informativna.

13. V preglednicah so bile vse vrednosti zaokrožene na najbližje celo število.

14. Vsi stroški so bili izračunani za monitoring ene ploskve na vrsto.

15. Stroški za povprečno desetletno obdobje monitoringa so bili izračunani kot povprečje prvih 50 let monitoringa (prvih pet obdobji monitoringa).

7.2.2 Ocena stroškov

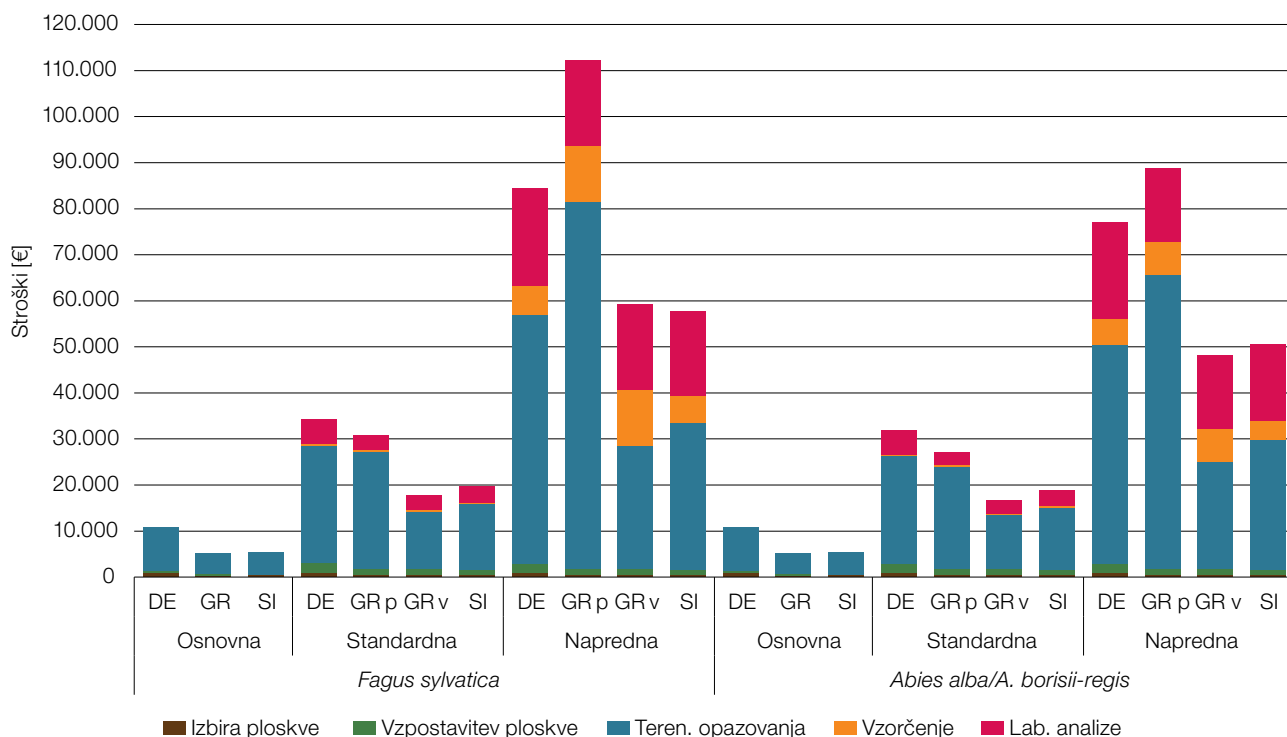
7.2.2.1 Stroški povprečnega desetletnega obdobja gozdnega genetskega monitoringa na vrsto, državo in raven monitoringa

Podrobnejše informacije o oceni stroškov, vključno z informacijami o številu delovnih ur za različne kategorije osebja, potrebnih za izvedbo različnih dejavnosti monitoringa, so navedene v podpoglavju 10.3 z naslovom Dodatne preglednice k 7. poglavju: Ocena stroškov.

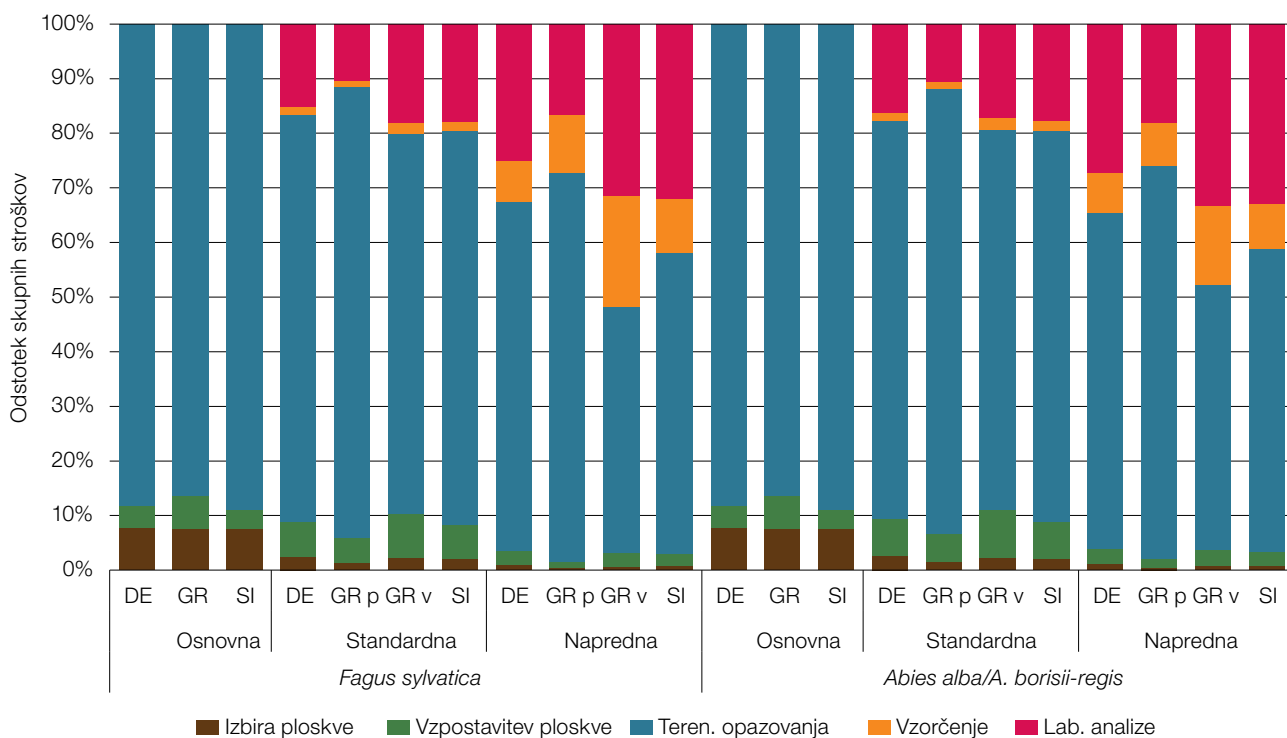
Preglednica 7.1: Stroški povprečnega desetletnega obdobja monitoringa na ploskev, vrsto, državo in raven monitoringa. Vse navedene vrednosti so v evrih (€). DE – Nemčija; GR f – Grčija, fotografska terenska opazovanja; GR v – Grčija, vizualna terenska opazovanja; SI – Slovenija.

<i>Fagus sylvatica</i> L.							
Raven	Država	Izbira ploskve	Vzpostavitev ploskve	Terenska opazovanja	Vzorčenje	Lab. analize	Skupaj
Osnovna	DE	832	426	9.472	0	0	10.730
	GR	388	307	4.422	0	0	5.117
	SI	415	186	4.883	0	0	5.484
Standardna	DE	832	2.184	25.530	460	5.198	34.203
	GR p *	388	1.455	25.328	377	3.182	30.729
	GR v *	388	1.455	12.329	377	3.182	17.730
	SI	415	1.235	14.286	346	3.522	19.805
Napredna	DE	832	2.184	53.872	6.434	21.088	84.409
	GR p *	388	1.455	79.735	12.036	18.605	112.219
	GR v *	388	1.455	26.697	12.036	18.605	59.181
	SI	415	1.235	31.880	5.748	18.394	57.674
<i>Abies alba</i> Mill./ <i>Abies borisii-regis</i> Maff.							
Raven	Država	Izbira ploskve	Vzpostavitev ploskve	Terenska opazovanja	Vzorčenje	Lab. analize	Skupaj
Osnovna	DE	832	426	9.472	0	0	10.730
	GR	388	307	4.422	0	0	5.117
	SI	415	186	4.883	0	0	5.484
Standardna	DE	832	2.184	23.272	415	5.198	31.900
	GR p *	388	1.455	22.156	377	2.856	27.232
	GR v *	388	1.455	11.642	377	2.856	16.718
	SI	415	1.235	13.420	346	3.309	18.726
Napredna	DE	832	2.184	47.367	5.670	20.892	76.945
	GR p *	388	1.455	63.843	7.044	16.007	88.737
	GR v *	388	1.455	23.330	7.044	16.007	48.224
	SI	415	1.235	28.147	4.184	16.577	50.559

* Pri fenoloških opazovanjih (terenskih opazovanjih) so v Grčiji uporabljali digitalno fotografiranje visoke ločljivosti in analizo slik, kar je prispevalo precej več kskupnim stroškom gozdnega genetskega monitoringa kot pristop, uporabljen v Nemčiji in Sloveniji, ki je temeljil na vizualnem opazovanju. Zaradi zagotavljanja primerljivejših rezultatov so bili pričakovani stroški vizualnih fenoloških opazovanj v Grčiji ocenjeni na podlagi podatkov iz Nemčije in Slovenije.



Slika 7.1: Ocenjeni stroški gozdnega genetskega monitoringa navadne bukve (*Fagus sylvatica*) in bele jelke/borisove jelke (*Abies alba/Abies borisii-regis*) za povprečno desetletno obdobje monitoringa. DE – Nemčija; GR f – Grčija, fotografska terenska opazovanja; GR v – Grčija, vizualna terenska opazovanja; SI – Slovenija.

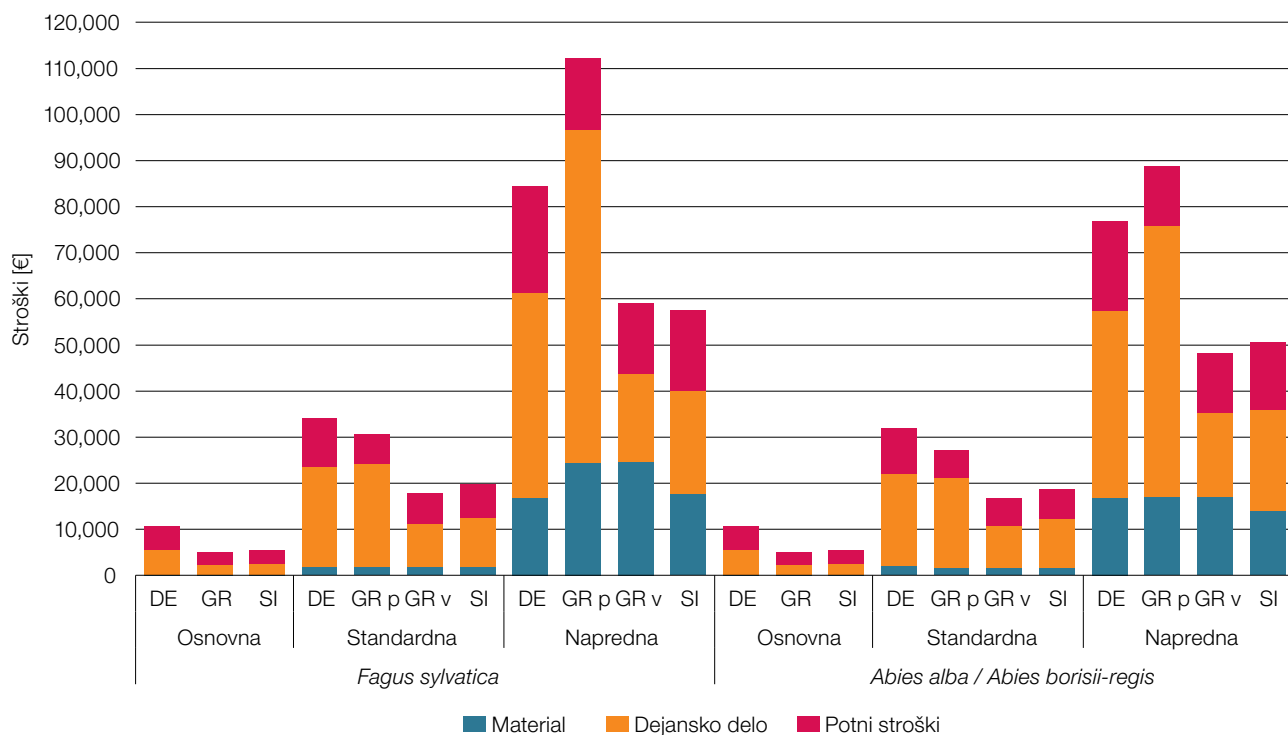


Slika 7.2: Relativni delež različnih dejavnosti gozdnega genetskega monitoringa v skupnih stroških povprečnega desetletnega obdobja monitoringa navadne bukve (*Fagus sylvatica*) in bele jelke/borisove jelke (*Abies alba/Abies borisii-regis*). DE – Nemčija; GR f – Grčija, fotografska terenska opazovanja; GR v – Grčija, vizualna terenska opazovanja; SI – Slovenija.

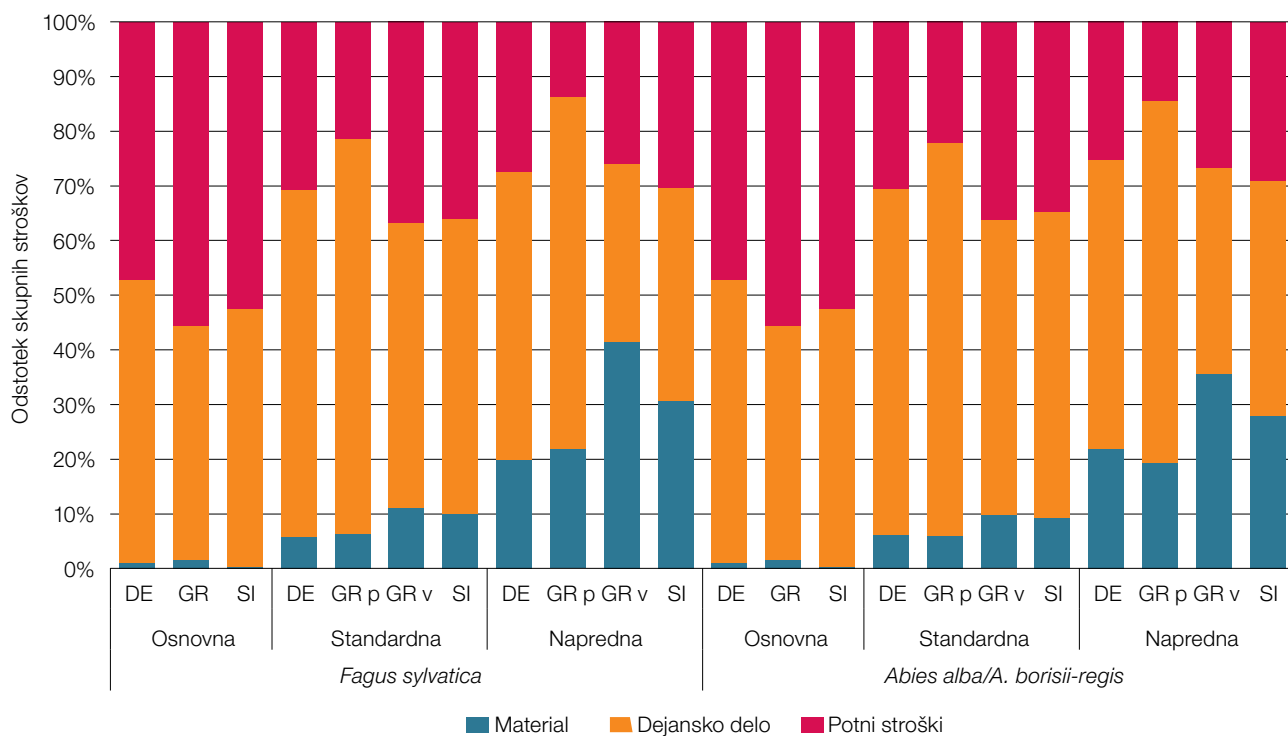
Preglednica 7.2: Delež različnih kategorij stroškov v skupnih stroških povprečnega desetletnega obdobja gozdnega genetskega monitoringa na ploskev, vrsto, državo in raven monitoringa. Potni stroški vključujejo stroške kilometrine, dnevnice in delovne ure za vožnjo. DE – Nemčija; GR f – Grčija, fotografska terenska opazovanja; GR v – Grčija, vizualna terenska opazovanja; SI – Slovenija.

<i>Fagus sylvatica</i> L.					
Raven	Država	Material [€]	Dejansko delo [€]	Potni stroški [€]	Skupaj [€]
Osnovna	DE	105	5.565	5.060	10.730
	GR	87	2.188	2.842	5.117
	SI	13	2.596	2.875	5.484
Standardna	DE	1.972	21.744	10.487	34.203
	GR p*	1.957	22.240	6.532	30.729
	GR v*	1.957	9.241	6.532	17.730
	SI	1.978	10.693	7.134	19.805
Napredna	DE	16.828	44.459	23.122	84.409
	GR p*	24.601	72.227	15.391	112.219
	GR v*	24.601	19.188	15.391	59.181
	SI	17.735	22.434	17.505	57.674
<i>Abies alba</i> Mill./ <i>Abies borisii-regis</i> Maff.					
Raven	Država	Material [€]	Dejansko delo [€]	Potni stroški [€]	Skupaj [€]
Osnovna	DE	105	5.565	5.060	10.730
	GR	87	2.188	2.842	5.117
	SI	13	2.596	2.875	5.484
Standardna	DE	1.972	20.164	9.764	31.900
	GR p*	1.659	19.536	6.037	27.232
	GR v*	1.659	9.022	6.037	16.718
	SI	1.737	10.474	6.515	18.726
Napredna	DE	16.852	40.640	19.453	76.945
	GR p*	17.147	58.707	12.883	88.737
	GR v*	17.147	18.194	12.883	48.224
	SI	14.078	21.805	14.676	50.559

* Pri fenoloških opazovanjih (terenskih opazovanjih) so v Grčiji uporabljali digitalno fotografiranje visoke ločljivosti in analizo slik, kar je prispevalo precej več k skupnim stroškom gozdnega genetskega monitoringa kot pristop, uporabljen v Nemčiji in Sloveniji, ki je temeljil na vizualnem opazovanju. Zaradi zagotavljanja primerljivejših rezultatov so bili pričakovani stroški vizualnih fenoloških opazovanj v Grčiji ocenjeni na podlagi podatkov iz Nemčije in Slovenije.



Slika 7.3: Delež različnih kategorij stroškov v skupnih stroških povprečnega desetletnega obdobja gozdnega genetskega monitoringa navadne bukve (*Fagus sylvatica*) in bele jelke/borisove jelke (*Abies alba/Abies borisii-regis*) na ploskev. Potni stroški vključujejo stroške kilometrine, dnevnice in delovne ure za vožnjo. DE – Nemčija; GR f – Grčija, fotografska terenska opazovanja; GR v – Grčija, vizualna terenska opazovanja; SI – Slovenija.



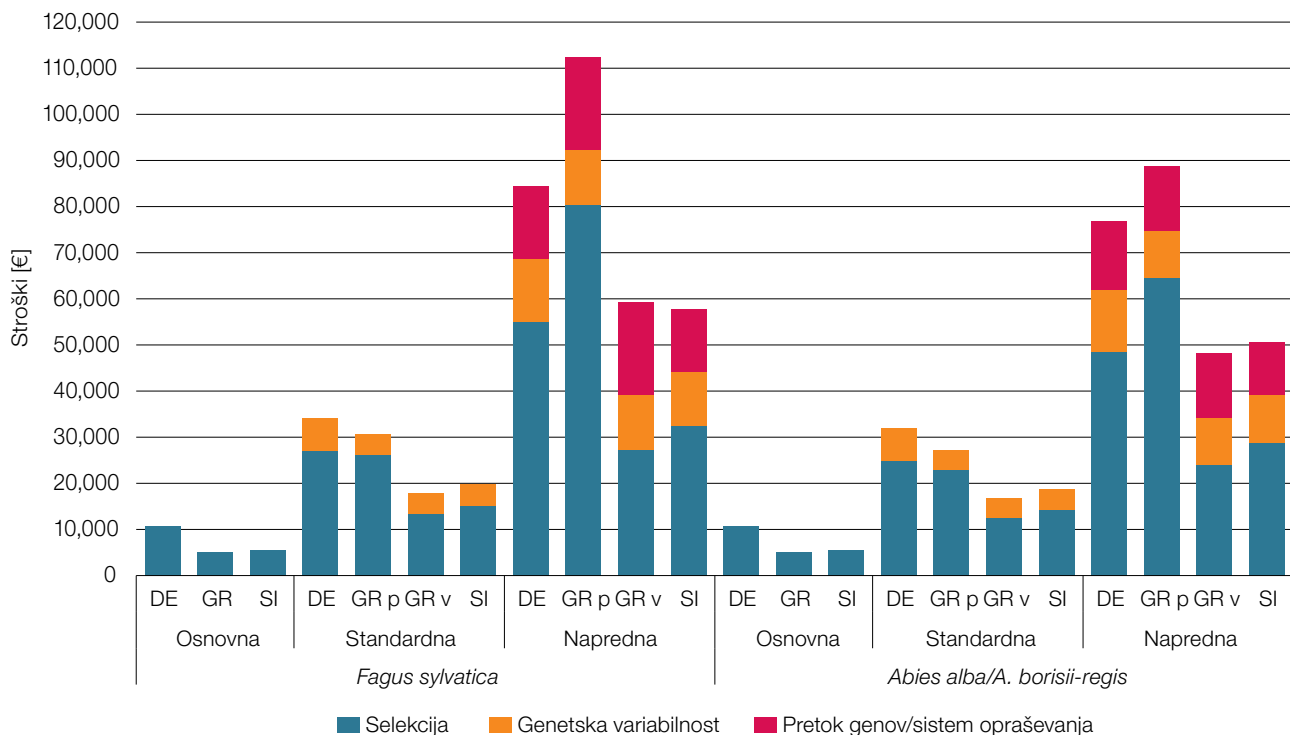
Slika 7.4: Relativni delež različnih kategorij stroškov v skupnih stroških povprečnega desetletnega obdobja gozdnega genetskega monitoringa navadne bukve (*Fagus sylvatica*) in bele jelke/borisove jelke (*Abies alba/Abies borisii-regis*) na ploskev. Potni stroški vključujejo stroške kilometrine, dnevnice in delovne ure za vožnjo. DE – Nemčija; GR f – Grčija, fotografska terenska opazovanja; GR v – Grčija, vizualna terenska opazovanja; SI – Slovenija.

7.2.2.2 Stroški na kazalnik

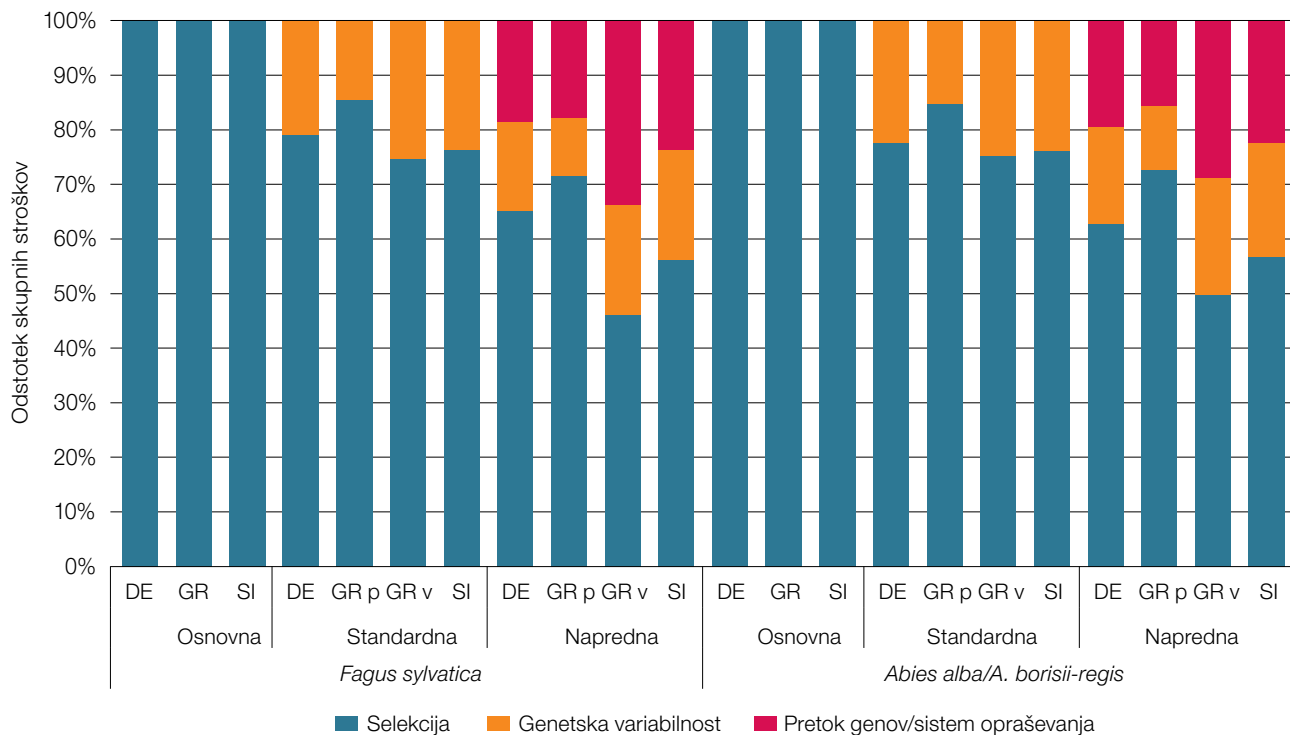
Preglednica 7.3: Delež kazalnikov genetskega monitoringa, in sicer *selekcije, genetske variabilnosti in pretoka genov/sistema opraševanja*, v skupnih stroških povprečnega desetletnega obdobja gozdnega genetskega monitoringa na ploskev, vrsto, državo in raven monitoringa. DE – Nemčija; GR f – Grčija, fotografska terenska opazovanja; GR v – Grčija, vizualna terenska opazovanja; SI – Slovenija.

<i>Fagus sylvatica</i> L.					
Raven	Država	Selekcija [€]	Genetska variabilnost [€]	Pretok genov/sistem opraševanja [€]	Skupaj [€]
Osnovna	DE	10.730	0	0	10.730
	GR	5.117	0	0	5.117
	SI	5.484	0	0	5.484
Standardna	DE	27.038	7.166	0	34.203
	GR p*	26.249	4.480	0	30.729
	GR v*	13.251	4.480	0	17.730
	SI	15.111	4.693	0	19.805
Napredna	DE	54.877	13.766	15.766	84.409
	GR p*	80.350	11.844	20.025	112.219
	GR v*	27.311	11.844	20.025	59.181
	SI	32.430	11.626	13.617	57.674
<i>Abies alba</i> Mill./ <i>Abies borisii-regis</i> Maff.					
Raven	Država	Selekcija [€]	Genetska variabilnost [€]	Pretok genov/sistem opraševanja [€]	Skupaj [€]
Osnovna	DE	10.730	0	0	10.730
	GR	5.117	0	0	5.117
	SI	5.484	0	0	5.484
Standardna	DE	24.780	7.121	0	31.900
	GR p*	23.078	4.154	0	27.232
	GR v*	12.564	4.154	0	16.718
	SI	14.246	4.480	0	18.726
Napredna	DE	48.372	13.607	14.966	76.945
	GR p*	64.457	10.328	13.951	88.737
	GR v*	23.945	10.328	13.951	48.224
	SI	28.697	10.566	11.296	50.559

* Pri fenoloških opazovanjih (terenskih opazovanjih) so v Grčiji uporabljali digitalno fotografiranje visoke ločljivosti in analizo slik, kar je prispevalo precej več k skupnim stroškom gozdnega genetskega monitoringa kot pristop, uporabljen v Nemčiji in Sloveniji, ki je temeljil na vizualnem opazovanju. Zaradi zagotavljanja primerljivejših rezultatov so bili pričakovani stroški vizualnih fenoloških opazovanj v Grčiji ocenjeni na podlagi podatkov iz Nemčije in Slovenije.



Slika 7.5: Delež različnih kazalnikov – selekcije, genske variabilnosti, pretoka genov/sistema oprashevanja – v skupnih stroških povprečnega desetletnega obdobja gozdnega genetskega monitoringa navadne bukve (*Fagus sylvatica* L.) in bele jelke/borisove jelke (*Abies alba* Mill./*Abies borisii-regis* Mattf.) na ploskev. DE – Nemčija; GR f – Grčija, fotografska terenska opazovanja; GR v – Grčija, vizualna terenska opazovanja; SI – Slovenija.



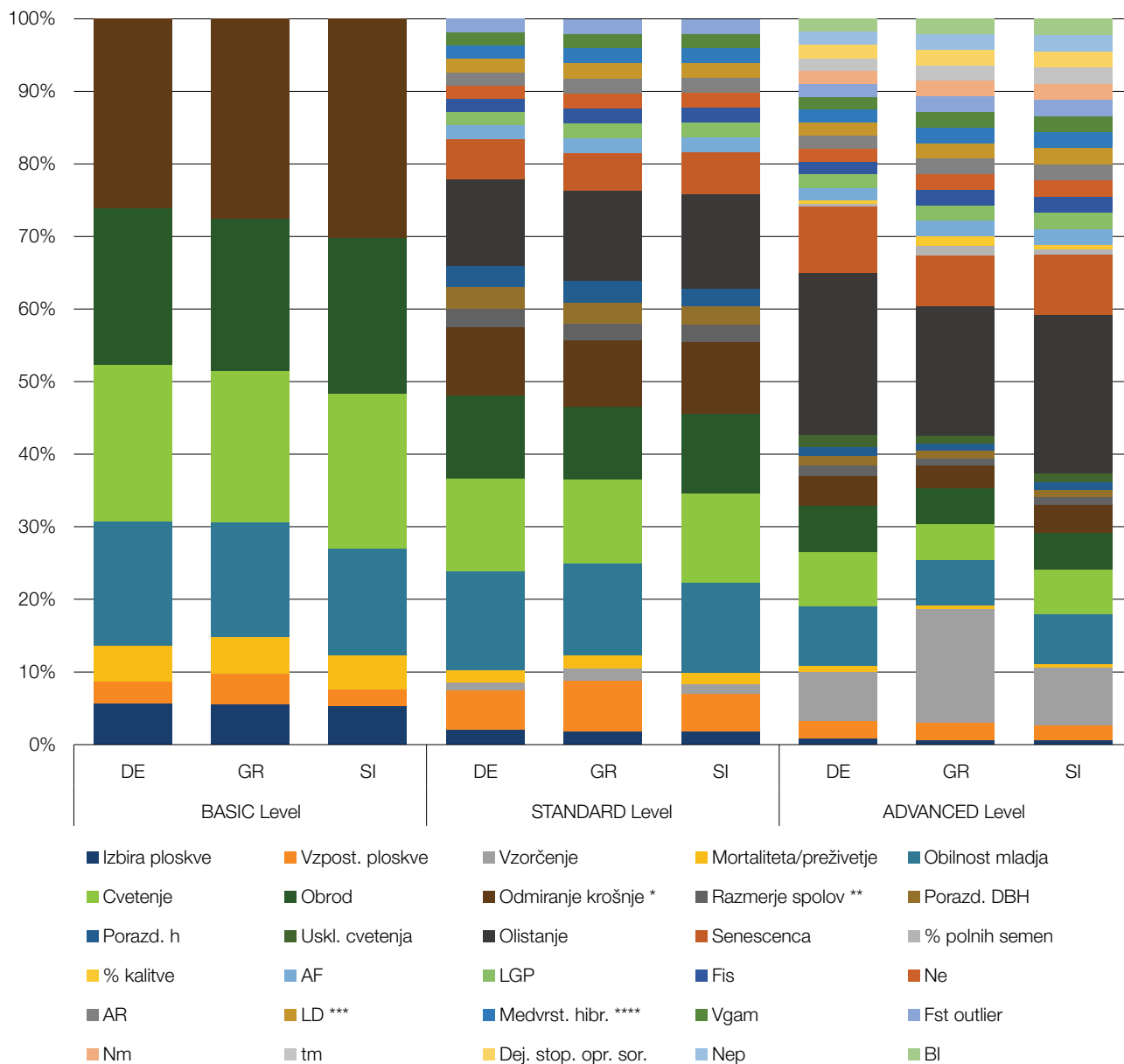
Slika 7.6: Relativni delež različnih kazalnikov – selekcije, genske variabilnosti, pretoka genov/sistema oprashevanja – v skupnih stroških povprečnega desetletnega obdobja gozdnega genetskega monitoringa navadne bukve (*Fagus sylvatica* L.) in bele jelke/borisove jelke (*Abies alba* Mill./*Abies borisii-regis* Mattf.) na ploskev. DE – Nemčija; GR f – Grčija, fotografska terenska opazovanja; GR v – Grčija, vizualna terenska opazovanja; SI – Slovenija.

7.2.2.3 Stroški na verifikator

Preglednica 7.4: Stroški posameznega verifikatorja/dodatnih informacij za povprečno desetletno obdobje gozdnega genetskega monitoringa na ploskev, državo in raven monitoringa na podlagi povprečij za navadno bukev in belo jelko/borisovo jelko. Za Grčijo so bili v izračunih upoštevani samo pričakovani stroški monitoringa z vizualnimi terenskimi opazovanji. Za vse države je bila upoštevana razdalja 100 km do ploskve gozdnega genetskega monitoringa. DE – Nemčija; GR – Grčija; SI – Slovenija. Izbira plosk. – izbira ploskve; vzpost. ploskve – vzpostavitev ploskve; terenska opaz. – terenska opazovanja/meritve; lab. analize – laboratorijske analize; porazd. debel. razr. – porazdelitev debelinskih razredov; porazd. viš. razr. – porazdelitev višinskih razredov; uskl. cvetenja – usklajenost cvetenja; AF – alelna frekvenca; LGP – latentni genetski potencial; F_{IS} – koeficient oprasaevanja med sorodniki; N_e – efektivna velikost populacije; AR – alelna bogastvo; LD – vezavno neravnovesje; medvrst. hibr. – medvrstna hibridizacija; t_m – multilokusna ocena oprasaevanja med nesrodnimi osebkami; N_m – ocena pretoka genov; V_{GAM} – hipotetična multilokusna gametska raznolikost; N_{ep} – efektivno število donorjev peloda; BI – stopnja oprasaevanja med sorodnimi straši. Vrsta: V – verifikator; DI – dodatne informacije. Kazalnik: I – selekcija; II – genetska variabilnost; III – pretok genov/sistem oprasaevanja; skupaj 1 – skupni stroški za povprečne enodomne, nehibridizirajoče vrste; skupaj 2 – skupni stroški za dvodomno vrsto z vsemi možnimi verifikatorji/dodatnimi informacijami.

Dejavnost	Parameter	Vrsta	Kazalnik	Stroški, OSNOVNA raven [€]			Stroški, STANDARDNA raven [€]			Stroški, NAPREDNA raven [€]		
				DE	GR	SI	DE	GR	SI	DE	GR	SI
Izbira plosk.	/	/	/	832	388	415	832	388	415	832	388	415
Vzpost. pl.	/	/	/	426	307	186	2.184	1.455	1.235	2.184	1.455	1.235
Vzorčenje	/	/	/	–	–	–	460	377	346	6.434	9.540	4.966
Terenska opaz.	mortaliteta/preživetje	V	I	717	351	364	717	351	364	717	351	364
	obilnost mladja	V	I	2.489	1.116	1.158	5.477	2.675	2.947	7.721	3.819	4.264
	cvetenje	V	I	3.132	1.477	1.680	5.174	2.420	2.952	7.017	3.060	3.862
	obrod	V	I	3.132	1.477	1.680	4.671	2.093	2.590	6.080	2.947	3.173
	odmiranje krošnje*	DI	I	3.788	1.950	2.370	3.788	1.950	2.370	3.788	1.950	2.370
	razmerje spolov**	DI	I	–	–	–	1030	481	562	1.403	633	758
	porazd. DBH	DI	I	–	–	–	1207	612	595	1.207	612	595
	porazd. h	DI	I	–	–	–	1207	612	595	1.207	612	595
	uskl. cvetenja	DI	I	–	–	–	–	–	–	1.597	642	832
	olistanje	DI	I	–	–	–	4.801	2.600	3.090	20.868	10.913	13.661
	senescenca	DI	I	–	–	–	2.283	1.101	1.372	8.574	4.260	5.233
Lab. analize	% polnih semen	V	I	–	–	–	–	–	–	416	808	374
	% kalitve	V	I	–	–	–	–	–	–	416	808	374
	AF	V	II	–	–	–	743	431	488	1.680	1.308	1.395
	LGP	V	II	–	–	–	743	431	488	1.680	1.308	1.395
	F_{IS}	V	II	–	–	–	743	431	488	1.680	1.308	1.395
	N_e	V	II	–	–	–	743	431	488	1.680	1.308	1.395
	AR***	V	II	–	–	–	743	431	488	1.680	1.308	1.395
	LD***	DI	II	–	–	–	743	431	488	1.680	1.308	1.395
	medvrst. hibr.****	DI	II	–	–	–	743	431	488	1.680	1.308	1.395
	V_{GAM}	DI	II	–	–	–	743	431	488	1.680	1.308	1.395
	F_{ST} test osamelcev	DI	II	–	–	–	743	431	488	1.680	1.308	1.395
	N_m	V	III	–	–	–	–	–	–	1.680	1.308	1.395
	t_m	V	III	–	–	–	–	–	–	1.680	1.308	1.395
	dejanska st. opr. sor.	V	III	–	–	–	–	–	–	1.680	1.308	1.395
N_{ep}	DI	III	–	–	–	–	–	–	1.680	1.308	1.395	
BI	DI	III	–	–	–	–	–	–	1.680	1.308	1.395	
Skupaj 1 [€]				10.728	5.117	5.484	34.210	17.701	19.919	85.428	55.905	56.683
Skupaj 2 [€]				14.516	7.067	7.855	39.770	20.564	23.339	92.300	59.795	61.206

* Samo *Fraxinus excelsior*; ** samo dvodomne in funkcionalno dvodomne vrste; *** AR – samo markerji SSR, LD – samo markerji SNP; **** samo za vrste, pri katerih medvrstna hibridizacija poteka v naravi.



Slika 7.7: Relativni delež verifikatorjev in dodatnih informacij v skupnih stroških za povprečno desetletno obdobje gozdnega genetskega monitoringa navadne bukve in bele jelke/borisove jelke na ploskev, državo in raven monitoringa na podlagi povprečij. Za Grčijo so bili v izračunih upoštevani samo pričakovani stroški monitoringa z vizualnimi terenskimi opazovanji. Za vse države je bila upoštevana razdalja 100 km do ploskve gozdnega genetskega monitoringa. DE – Nemčija; GR – Grčija; SI – Slovenija. Vzpost. ploskve – vzpostavitev ploskve; Porazd. DBH – porazdelitev debelinskih razredov; porazd. h – porazdelitev višinskih razredov; uskl. cvetenja – usklajenost cvetenja; AF – alelna frekvenca; LGP – latentni genetski potencial; F_{IS} – koeficient opravevanja med sorodniki; N_e – efektivna velikost populacije; AR – alelna bogastvo; LD – vezavno neravnovesje; medvrst. hibr. – medvrstna hibridizacija; t_m – multilokusna ocena opravevanja med nesrodnimi osebkami; N_m – ocena pretoka genov; V_{GAM} – hipotetična multilokusna gametska raznolikost; Dej. stop. opr. sor. – dejanska stopnja opravevanja med sorodnimi osebkami; N_{ep} – efektivno število donorjev peloda; BI – stopnja opravevanja med sorodnimi starši.

* Samo *Fraxinus excelsior*; ** samo dvodomne vrste; *** AR – samo markerji SSR, LD – samo markerji SNP; **** samo za vrste, pri katerih medvrstna hibridizacija poteka v naravi.

7.2.2.5 Stroški povprečnega desetletnega obdobja monitoringa za vse države/vrste

Preglednica 7.5: Stroški povprečnega desetletnega obdobja gozdnega genetskega monitoringa na ploskev in raven monitoringa. Povprečne vrednosti so bile izračunane iz podatkov za vse tri države in obe vrsti. Za Grčijo so bili v izračunu povprečnih vrednosti upoštevani samo pričakovani stroški monitoringa z vizualnimi terenskimi opazovanji. Za vse države in vrste je bila upoštevana razdalja 100 km do ploskve gozdnega genetskega monitoringa. SD – standardna deviacija.

Raven	Izbira ploskve		Vzpostavitev ploskve		Terenska opazovanja		Vzorčenje		Lab. analize		Skupaj	
	[€]	SD	[€]	SD	[€]	SD	[€]	SD	[€]	SD	[€]	SD
Osnovna	545	203	307	98	6.259	2.280	0	0	0	0	7.110	2.564
Standardna	545	203	1.625	406	16.747	5.514	387	40	3.878	954	23.180	7.074
Napredna	545	203	1.625	406	35.215	11.333	6.853	2.477	18.594	1.928	62.832	13.346

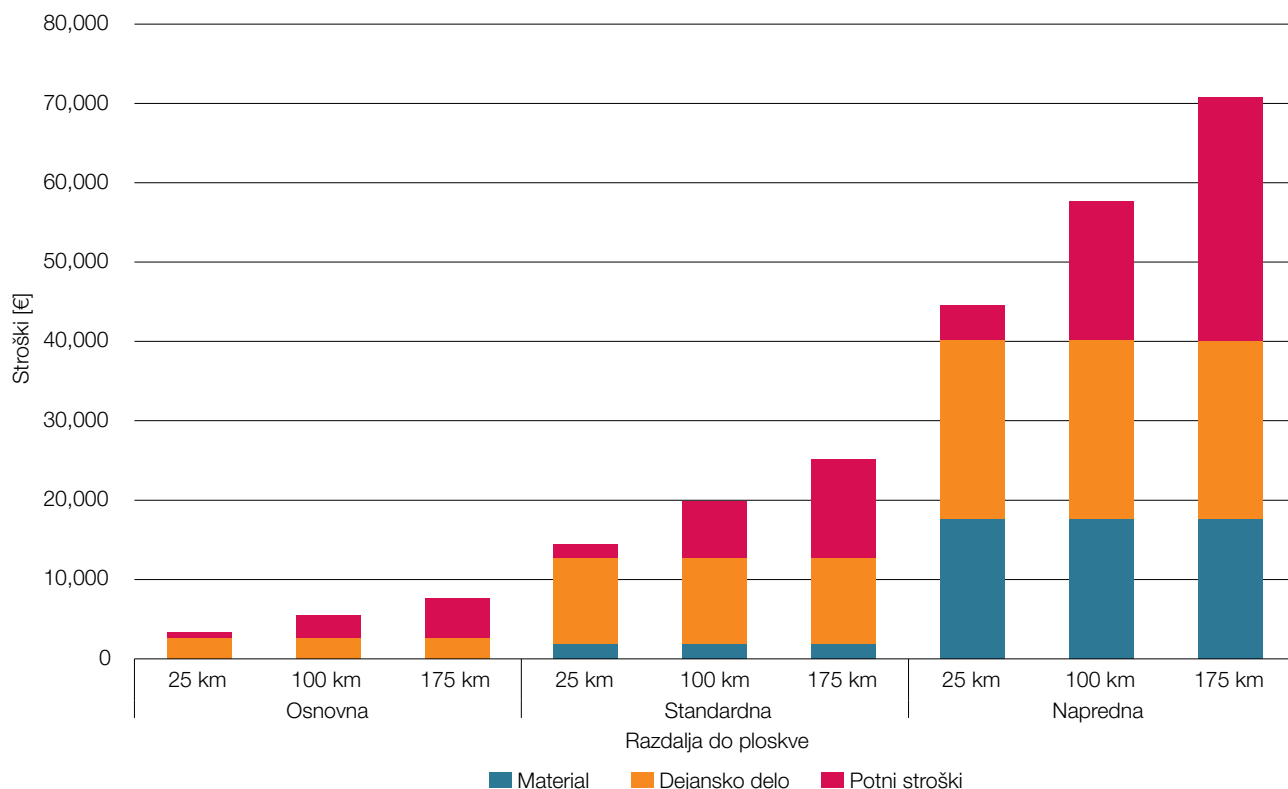
Preglednica 7.6: Delež različnih kategorij stroškov v skupnih stroških povprečnega desetletnega obdobja gozdnega genetskega monitoringa na ploskev in raven monitoringa. Povprečne vrednosti so bile izračunane iz podatkov za vse tri države in obe vrsti. Za Grčijo so bili v izračunu povprečnih vrednosti upoštevani samo pričakovani stroški monitoringa z vizualnimi terenskimi opazovanji. Za vse države in vrste je bila upoštevana razdalja 100 km do ploskve gozdnega genetskega monitoringa. SD – standardna deviacija.

Raven	Material		Dejansko delo		Dejansko delo		Potni stroški		Potni stroški		Skupaj	
	[€]	SD	[del. ure]	SD	[€]	SD	[del. ure]	SD	[€]	SD	[€]	SD
Osnovna	68	40	152	3	3.450	1.505	93	7	3.593	1.038	7.110	2.564
Standardna	1.879	130	614	28	13.556	5.285	233	42	7.745	1.726	23.180	7.074
Napredna	17.873	3.224	1.314	68	27.786	10.595	551	152	17.172	3.379	62.832	13.346

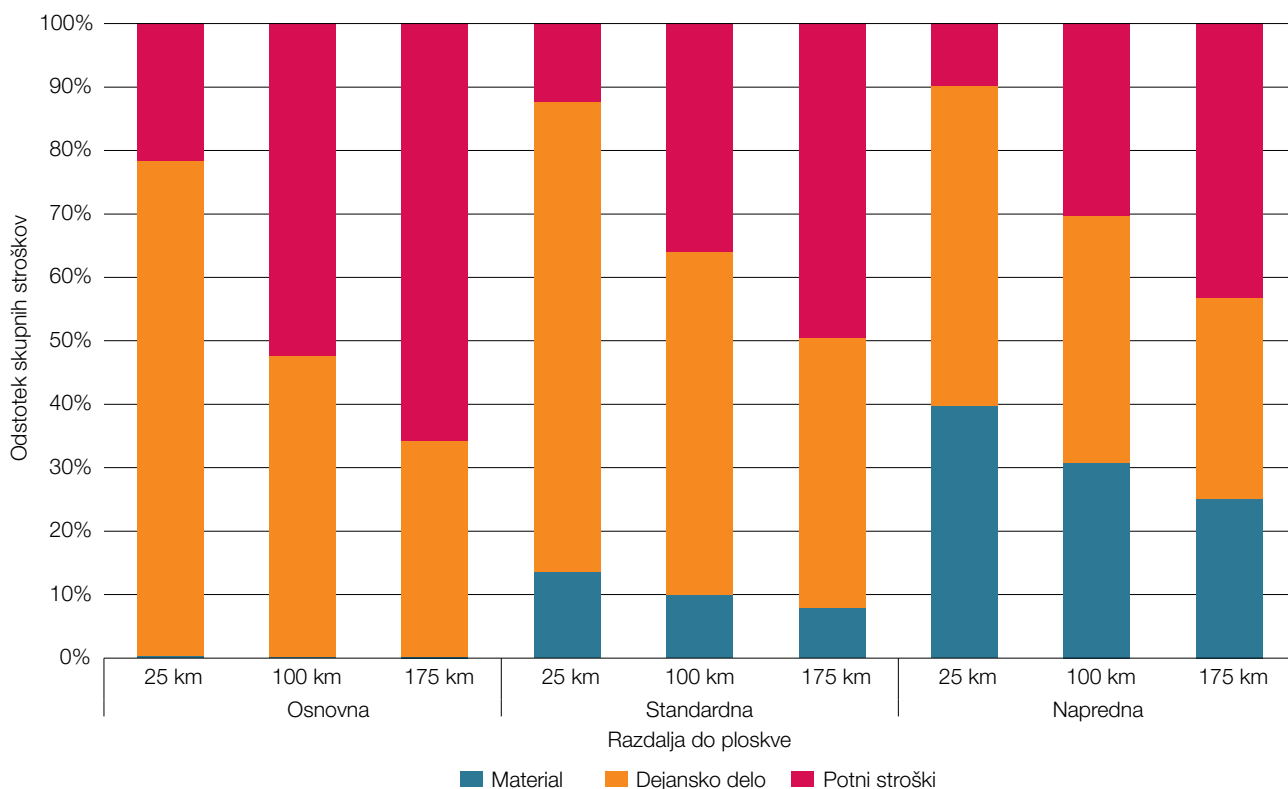
6.1.1.6 Vpliv oddaljenosti na stroške povprečnega desetletnega obdobja gozdnega genetskega monitoringa

Potni stroški lahko predstavljajo precejšen delež v skupnih stroških gozdnega genetskega monitoringa in povprečno predstavljajo 52 %, 34 % oziroma 27 % skupnih stroškov na osnovni, standardni oziroma napredni ravni, izračunano za potovalno razdaljo 100 km do ploskve gozdnega genetskega monitoringa. Razdalja do ploskve gozdnega genetskega monitoringa se bo v realnem življenju neizogibno razlikovala. V projektu LIFE GENMON je razdalja do ploskve na primer znašala od 15 do 175 km. Zato so bili ocenjeni tudi učinki oddaljenosti na skupne stroške povprečnega desetletnega obdobja gozdnega genetskega monitoringa na primeru gozdnega genetskega monitoringa navadne bukve v Sloveniji:

- stroški so bili izračunani za desetletno obdobje gozdnega genetskega monitoringa na podlagi povprečja prvih 50 let monitoringa;
- potni stroški so bili izračunani za tri razdalje od ustanove do ploskve: 25 km, 100 km in 175 km. Druge kategorije stroškov, tj. stroški materiala in stroški dejanskega dela, niso bile spremenjene.



Slika 7.8: Delež različnih kategorij stroškov v skupnih stroških povprečnega desetletnega obdobja genetskega monitoringa na ploskev navadne bukve (*Fagus sylvatica* L.) v Sloveniji glede na razdaljo do ploskve. Predstavljene so vrednosti za vse tri ravni, tj. osnovno, standardno in napredno.



Slika 7.9: Relativni delež različnih kategorij stroškov v skupnih stroških povprečnega desetletnega obdobja genetskega monitoringa na ploskev navadne bukve (*Fagus sylvatica* L.) v Sloveniji glede na razdaljo do ploskve. Predstavljene so vrednosti za vse tri ravni, tj. osnovno, standardno in napredno.

Preglednica 7.7: Delež različnih kategorij stroškov v skupnih stroških povprečnega desetletnega obdobja genetskega monitoringa na ploskev navadne bukve (*Fagus sylvatica* L.) v Sloveniji glede na razdaljo do ploskve.

Raven	Razdalja do ploskve [km]	Material [€]	Dejansko delo [€]	Potni stroški [€]	Skupaj [€]
Osnovna	25	13	2.596	719	3.328
	100	13	2.596	2.875	5.484
	175	13	2.596	5.031	7.641
Standardna	25	1.978	10.693	1.784	14.454
	100	1.978	10.693	7.134	19.805
	175	1.978	10.693	12.485	25.156
Napredna	25	17.735	22.434	4.376	44.544
	100	17.735	22.434	17.505	57.674
	175	17.735	22.434	30.635	70.803

7.3 Sklepi in priporočila

Iz vidika dejavnosti, potrebnih za izvedbo gozdnega genetskega monitoringa, predstavljajo *terenska opazovanja in meritve* največji delež skupnih stroškov gozdnega genetskega monitoringa (preglednica 7.1, sliki 7.1 in 7.2). Pri razdalji 100 km do ploskve *terenska opazovanja in meritve* predstavljajo povprečno 88 %, 72 % oziroma 55 % skupnih stroškov na osnovni, standardni oziroma napredni ravni monitoringa.

Od treh kategorij stroškov *dejansko delo* predstavlja največji delež v skupnih stroških gozdnega genetskega monitoringa. Pri razdalji 100 km do ploskve *dejansko delo* predstavlja povprečno 47 %, 57 % oziroma 43 % skupnih stroškov na osnovni, standardni oziroma napredni ravni monitoringa.

Kategorija stroškov *potni stroški* (kilometrini, dnevnice, delovne ure za vožnjo) ima lahko precejšen učinek na skupne stroške gozdnega genetskega monitoringa. Pri razdalji 100 km do ploskve *potni stroški* predstavljajo povprečno 52 %, 34 % oziroma 27 % skupnih stroškov na osnovni, standardni oziroma napredni ravni monitoringa. Delež *potnih stroškov* v skupnih stroških gozdnega genetskega monitoringa je neposredno odvisen od razdalje do ploskve in lahko pri večji oddaljenosti (glej Preglednico 7.7, Sliki 7.8 in 7.9) preseže 40 % skupnih stroškov na vseh ravneh monitoringa.

Delež kategorije stroškov *material* (potrošni material, material in storitve pri zunanjih izvajalcih, potrebne za izvedbo dejavnosti gozdnega genetskega monitoringa) v skupnih stroških gozdnega genetskega monitoringa se precej razlikuje glede na raven in povprečno zanaša 1 %, 9 % oziroma 30 % skupnih stroškov na osnovni, standardni oziroma napredni ravni. Poleg tega, da je potrebna več potrošnega materiala za laboratorijsko analizo, na napredni ravni precejšen delež stroškov *materiala* predstavlja tudi vzorčenje, in sicer povprečno 25 %.

Pri stroških gozdnega genetskega monitoringa ni bilo ugotovljenih večjih razlik med analiziranimi vrstama na osnovni ravni, vendar so skupni stroški gozdnega genetskega monitoringa bele jelke/borisove jelke povprečno 6 % oziroma 13 % nižji kot skupni stroški gozdnega genetskega monitoringa navadne bukve na standardni oziroma napredni ravni. Razlog ugotovljenih nižjih stroškov gozdnega genetskega monitoringa jelke je ta, da se parameter *senescenca* za jelko ne spremlja. Podobne rezultate pričakujemo tudi za druge primerjave sestojnih listavcev in iglavcev.

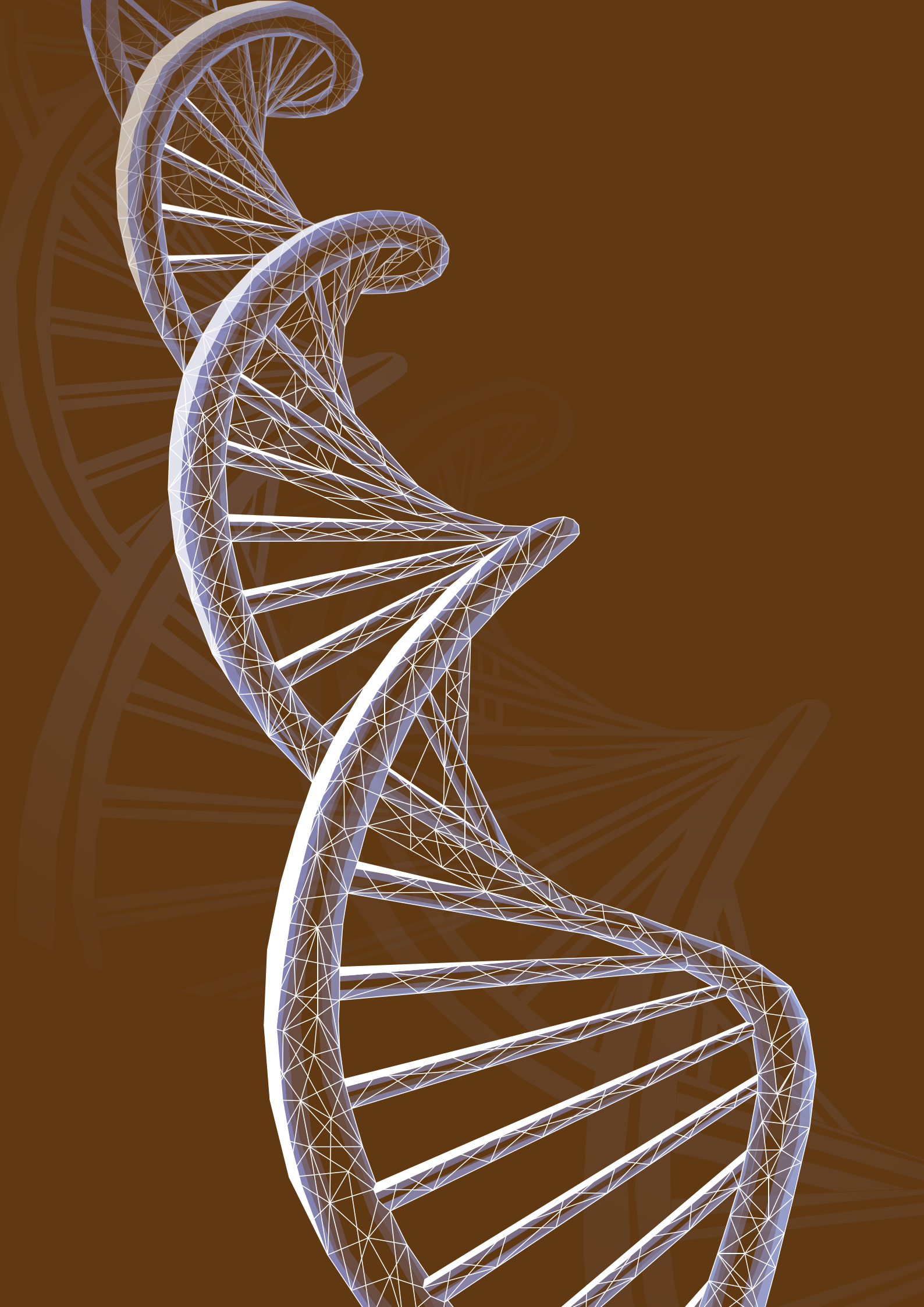
Obe vrsti, analizirani pri projektu LIFE GENMON, sta sestojni in enodomni. Stroški gozdnega genetskega monitoringa manjšinskih in dvodomnih vrst ter vrst, ki hibridizirajo in/ali tvorijo klone, bodo višji zaradi več terenskega dela, opazovanj (razmerje med spoloma, odmiranje krošnje (*Fraxinus excelsior*)) in/ali dodatnih laboratorijskih analiz (identifikacija klonov, hibridov), ki jih je treba izvesti. Na podlagi ocene stroškov verifikatorjev in dodatnih informacij (preglednica 7.4) bi bili skupni stroški gozdnega genetskega monitoringa manjšinskih dvodomnih vrst,

ki zahtevajo spremljanje vseh predlaganih verifikatorjev in dodatnih informacij, višji za najmanj 39 % na osnovni, 17 % na standardni in 8 % na napredni ravni.

Ocenjeni stroški gozdnega genetskega monitoringa so najvišji v Nemčiji – povprečno za 84 % višji kot v Grčiji in za 72 % višji kot v Sloveniji, stroški gozdnega genetskega monitoringa v Sloveniji pa so bili za 7 % višji kot v Grčiji. Daleč najpomembnejši razlog za ugotovljene razlike v stroških gozdnega genetskega monitoringa med državami so razlike v višini bruto urne postavke za upoštevane kategorije osebja.

7.3.1 Priporočila za zniževanje stroškov

1. Za izvedbo vseh dejavnosti gozdnega genetskega monitoringa uporabite dobro usposobljeno in izkušeno osebje. Izkušeno osebje bo naloge opravilo hitreje in z manj napakami, ki bi zahtevale ponavljanje naloge, zato boste prihranili čas in denar.
2. Delo dobro organizirajte. Nekatera terenska opazovanja ali meritve je mogoče izvesti v okviru istega obiska ploskve. Beleženje koordinat GPS ter merjenje prsnega premera in višine izbranih dreves lahko na primer vse izvedeta dva terenska tehnika v istem dnevu. S takim pristopom boste zmanjšali število voženj na ploskev in posledično potne stroške.
3. Priporočljivo je, da obsežnega fotografskega dokumentiranja ne uporabljate kot osnovni pristop za spremljanje fenologije, saj povečuje skupne stroške gozdnega genetskega monitoringa na standardni in napredni ravni za povprečno 77 %!
4. Najbolj spremenljiva kategorija stroškov so *potni stroški*. Ker je gozdni genetski monitoring dolgotrajen proces, lahko *potni stroški* predstavljajo precejšen delež skupnih stroškov gozdnega genetskega monitoringa. Za zmanjšanje prispevka *potnih stroškov* k skupnim stroškim gozdnega genetskega monitoringa je mogoče doseči z naslednjimi ukrepi:
 - V postopku izbire ploskve za gozdni genetski monitoring se običajno pregleda več različnih ploskev in oceni njihova primernost. Če več različnih ploskev izpolnjuje vsa merila za ploskev za gozdni genetski monitoring (2. poglavje), izberite tisto, ki je najbližje ustanovi, zadolženi za izvedbo gozdnega genetskega monitoringa.
 - V gozdni genetski monitoring vključite Zavod za gozdove, ki bo izvedel terenska opazovanja in meritve. Zavod za gozdove je organiziran kot mreža lokalnih enot po vsej državi. Lokalni ali regionalni gozdarji dobro poznajo gozdove na svojem območju in bodo morali prevoziti veliko krajšo pot, če bo ploskev za gozdni genetski monitoring na njihovem območju. Ustrezno usposabljanje gozdarjev (ali drugega osebja) je ključno za zagotavljanje doslednosti in primerljivosti terenskih meritev in opazovanj, zato je treba organizirati delavnice ali usposabljanja.
 - Za opravljanje intenzivnega terenskega dela na ploskvah za gozdni genetski monitoring, do katerih je vožnja daljša, ki ga ni mogoče opraviti v enem samem dnevu, na primer vzpostavitve ploskve ali vzorčenja semena, svetujemo, da terensko osebje prenoči v bližini ploskve in se ne vozi vsak dan na ploskev in nazaj. Na ta način je vožnje manj, delovni čas pa je bolje izkoriščen, kar nazadnje zmanjša skupne stroške takih dejavnosti kljub dodatnim stroškom bivanja.
 - Za opravljanje intenzivnega terenskega dela zadolžite več osebja, če je mogoče. Več ljudi bo lahko opravilo več dela v istem času, to pa bo zmanjšalo tudi potne stroške na osebo in število voženj, potrebnih za končanje naloge.
5. Sodelujte s sosednjimi državami – državam, ki spremljajo isto vrsto in spadajo v isto cono po okoljski klasifikaciji, ni vedno treba ločeno izvajati gozdnega genetskega monitoringa.



poglavje 8

Podpora odločanju pri izbiri intenzivnosti gozdnega genetskega monitoringa

Marjana WESTERGREN¹, Marko BAJC¹, Filippos A. ARAVANOPOULOS²,
Rok DAMJANIĆ¹, Barbara FUSSI³, Darius KAVALIAUSKAS³, Fotios KIOURTSIS⁴,
Paraskevi ALIZOTI², Andrej BREZNIKAR⁵, Hojka KRAIGHER¹

Navedba: Westergren in sod. (2020) Podpora odločanju pri izbiri intenzivnosti GGM. V: Bajc in sod. (ur.), Priročnik za gozdni genetski monitoring. Gozdarski inštitut Slovenije: založba Silva Slovenica, Ljubljana, str. 151–156. <http://dx.doi.org/10.20315/SFS.168>

Povezane ustanove:

1. Gozdarski inštitut Slovenije (GIS), Slovenija
2. Aristotelova univerza v Solunu (AUTh), Grčija
3. Bavarski urad za gozdno genetiko (AWG), Nemčija
4. Decentralizirana uprava Makedonije in Trakije, Generalni direktorat za gozdarstvo in podeželje, Grčija
5. Zavod za gozdove Slovenije (ZGS), Slovenija

8.1 Uvod in cilj

To poglavje je namenjeno odločevalcem v lokalnem, nacionalnem, regionalnem in evropskem merilu, da bi se lažje odločili pri izbiri najustreznejše ravni gozdnega genetskega monitoringa (GGM) glede na to, kakšna vprašanja se jim zastavljajo in koliko človeških in finančnih virov ter strokovnega znanja imajo na voljo. Priporočljivo je, da se odločevalci posvetujejo z znanstveniki, ki delujejo na področju gozdov in genetike, da bi ugotovili, katera vprašanja so na nacionalni ravni najpomembnejša.

Informacije v spodnjih preglednicah bodo v pomoč pri odločitvi, kakšna raven GGM naj se uveljavi. V Preglednici 8.1 je seznam vprašanj, na katera lahko odgovorimo ob pomoči podatkov, ki jih pridobimo z ocenjevanjem verifikatorjev in dodatnih informacij v predlaganem sistemu GGM. Stroški popisovanja posameznih verifikatorjev v 10-letnem obdobju so predstavljeni v Preglednici 8.2.

8.2 Vprašanja, na katera odgovarja GGM

V preglednici 8.1 je nepopoln seznam vprašanj, na katera lahko odgovori GGM.

Preglednica 8.1: Nekaj vprašanj, na katera lahko odgovori posamezna raven gozdnega genetskega monitoringa.

Vprašanje	Raven gozdnega genetskega monitoringa		
	Osnovna	Standardna	Napredna
Ali je obrod dovolj pogost (kot se za določeno drevesno vrsto pričakuje)?	x	x	x
Ali je obrod dovolj obilen (kot se za določeno drevesno vrsto pričakuje)?	x	x	x
Ali prihaja do nepričakovane smrtnosti, ki bi lahko povzročila zmanjšanje populacije?	x	x	x
Ali je naravna obnova zadostna za ohranjanje evolucijskega potenciala?	x	x	x
Ali je učinkovita velikost populacije zadostna za ohranjanje evolucijskega potenciala?		x	x
Ali se populacija po ocenah demografskih modelov dolgoročno zmanjšuje?		x	x
Ali je variabilnost v populaciji (genetska – molekularni markerji, fenotipska – variacija lastnosti) zadostna za ohranjanje evolucijskega potenciala?		x	x
Kaj je razlog za nizko obilnost mladja (premalo cvetenja, nesinhroniziranost moškega in ženskega cvetenja, zaustavljen razvoj semena ali odsotnost kalitve)?			x
Ali je v populaciji veliko opravevanja med sorodnimi starši? Ali se povečuje?			x
Ali lahko pretok genov iz drugih populacij prepreči nazadovanje opazovane populacije?			x
Ali ima populacija potencial, da premaga izzive okolja?			x

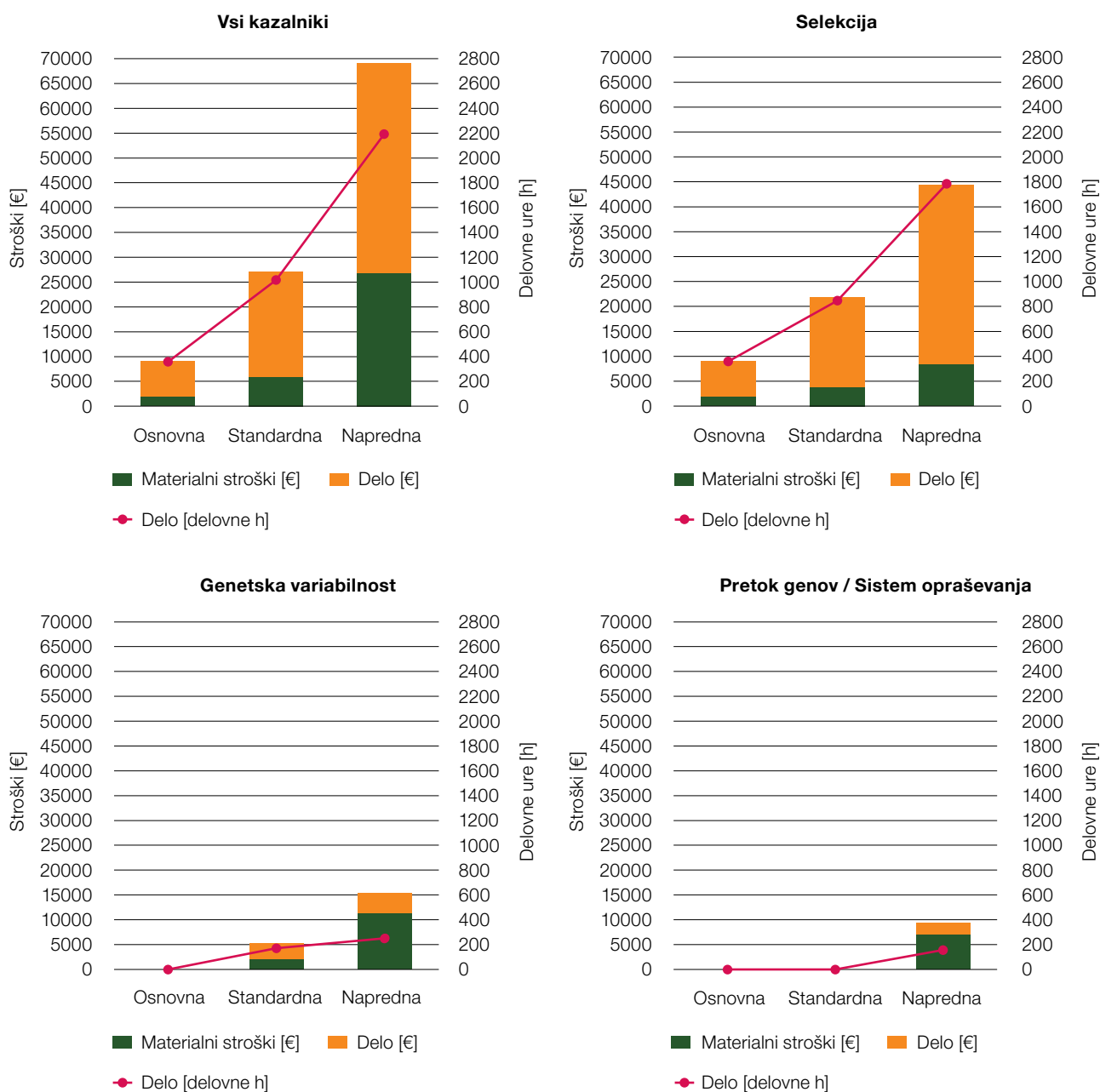
Kazalnik Selekcija z verifikatorji na osnovni ravni je primeren, da ugotovimo ali lahko pričakujemo nazadovanje gozdnega sestoja. Vendar monitoring tega kazalnika na osnovni ravni ne more pojasniti vzrokov za spremembe.

Za celovito razumevanje kazalnika moramo popisati vse verifikatorje za ta kazalnik na določeni ravni, skladno z ravno monitoringa. Štirje verifikatorji na osnovni ravni kazalnika Selekcija (najmanjše mogoče število verifikatorjev za monitoring) bodo sprožili alarm, če opazovana populacija nazaduje, vendar nam ne bodo omogočili razumevanja morebitnih vzrokov za upad. Za to bi morali spremljati in analizirati tudi druga dva kazalnika in verifikatorje na višjih ravneh.

8.3 Stroški gozdnega genetskega monitoringa

Stroške posameznega verifikatorja v 10-letnem obdobju monitoringa ene ploskve za genetski monitoring, ki jo sestavlja 50 odraslih dreves na vseh ravneh monitoringa ter dodatnih 40 naravnih pomladitvenih jeder (vsako s površino 1 m²) na standardni in napredni ravni, smo izračunali kot povprečje stroškov, ki so nastali na šestih ploskvah za monitoring v treh državah (Nemčija, Slovenija, Grčija) pri spremljanju dveh sestojnih vrst: navadne bukve (*Fagus sylvatica* L.) ter kompleksa bele jelke in Borisove jelke (*Abies alba* Mill./*A. borisii regis* Mattf.). Stroški za posamezni verifikator so povezani s pogostostjo opazovanja verifikatorjev in predpostavkami, opisanimi v sedmem poglavju (Ocena stroškov). Stroški se delijo na:

- **materialne stroške:** potrošni material, kilometrina za pot do ploskve in nazaj, dnevnice in stroški vzorčenja/genetskih analiz pri zunanjih izvajalcih;
- **delovne ure:** število delovnih ur, potrebnih za terenska opazovanja, vzorčenje, laboratorijsko delo in genotipizacijo.



Slika 8.1: Skupni stroški genetskega monitoringa na desetletje, materialni stroški in potreben čas glede na raven monitoringa.

Preglednica 8.2: Strošek in informativna vrednost verifikatorjev in dodatnih informacij ter izbire, vzpostavitve in vzorčenja ploskve za monitoring 50 odraslih dreves in 40 naravnih pomladitvenih jeder (po 20 jeder iz vsakega od dveh obrodov) v obdobju 10 let. Stroški se delijo na **materialne stroške**, ki obsegajo potrošni material, kilometrino za pot do ploskve in nazaj, dnevnice in stroške vzorčenja/genetskih analiz pri zunanjih izvajalcih, ter **delovne ure**, ki so potrebne za izvajanje terenskih opazovanj, vzorčenja, potovanja, laboratorijskega dela, genotipizacije in analize podatkov. Vrsta spremljane prvine: V = verifikator, DI = dodatna informacija. Informativna vrednost: V = visoka, S = srednja, N = nizka. Vrsta dela: T = terensko delo, L = laboratorijsko delo. Sivo senčenje: verifikator se na tej ravni ne popisuje. Vrednosti so zaokrožene na najbližjih 10 EUR in 5 delovnih ur.

Kazalnik	Ime verifikatorja	Vrsta	Inf. vred.	Vrsta dela	Osnovna raven		Standardna raven		Napredna raven	
					Material [€]	Delo [delovne ure]	Material [€]	Delo [delovne ure]	Material [€]	Delo [delovne ure]
Selekcija	Mortaliteta/preživetje	V	S	T	20	20	20	20	20	20
	Obilnost mladja	V	V	T	240	60	450	155	620	230
	Cvetenje	V	S	T	580	65	750	125	860	175
	Obrod	V	S	T	580	65	690	110	690	160
	% polnih semen	V	N	L					160	20
	% kalitve	V	N	L					160	20
	Odmiranje krošnje (jesen)	DI	N	T	430	110	430	110	430	110
	Razmerje med spoli	DI	N	T			150	25	170	35
	Porazdelitev debelinskih razredov	DI	N	T			40	35	40	35
	Porazdelitev višinskih razredov	DI	N	T			40	35	40	35
	Usklajenost cvetenja	DI	N	T					0	45
	Olistanje	DI	N	T			630	130	3.160	605
	Senescenca	DI	N	T			230	60	1.150	240
Genetska variabilnost	Alelne frekvence	V	S	L			210	15	1.040	20
	Latentni genetski potencial	V	S	L			210	15	1.040	20
	Koeficient opravevanja med sorodniki	V	S	L			210	15	1.040	20
	Efektivna velikost populacije	V	V	L			210	15	1.040	20
	Alelno bogastvo	V	S	L			210	15	1.040	20
	Vezavno neravnovesje	V	S	L			210	15	1.040	20
	Medvrstna hibridizacija	DI	N	L			210	15	1.040	20
	Genetska množičnost	DI	N	L			210	15	1.040	20
	F test osamelcev	DI	N	L			210	15	1.040	20
Pretok genov/sistem opravevanja	Pretok genov	V	S	L					1.040	20
	Multilokusna ocena opravevanja med nesrodnimi osebki	V	S	L					1.040	20
	Dejanska stopnja opravevanja med sorodniki	V	V	L					1.040	20
	Efektivno št. donorjev peloda	DI	N	L					1.040	20
	Opravevanje med sorodnimi starši	DI	N	L					1.040	20
Druge dejavnosti	Izbira ploskve	/	/	/	70	20	70	20	70	20
	Vzpostavitev ploskve	/	/	/	120	10	600	50	600	50
	Vzorčenje	/	/	/	0	0	92	20	5.130	100

Povprečni stroški za posamezni verifikator oziroma dodatno informacijo ter za izbiro ploskve, njeno vzpostavitev in vzorčenje so predstavljeni v Preglednici 8.2. Na **osnovni ravni** je povprečni skupni strošek desetletnega genetskega monitoringa približno **2.000 EUR in 360 delovnih ur**. Skupni strošek desetletnega genetskega monitoringa na **standardni ravni** je približno **5.900 EUR in 1.020 delovnih ur**, na **napredni ravni** pa **26.800 EUR in 2.190 delovnih ur**.

Skupni strošek desetletnega monitoringa kazalnika Selekcija je na **osnovni ravni** približno **2.000 EUR in 360 delovnih ur**, na **standardni ravni** **3.800 EUR in 850 delovnih ur**, na **napredni ravni** pa **8.500 EUR in 1.790 delovnih ur**. Skupni strošek desetletnega monitoringa kazalnika Genetska variabilnost je na **standardni ravni** približno **2.100 EUR in 170 delovnih ur**, na **napredni ravni** pa **11.250 EUR in 250 delovnih ur**. Skupni strošek desetletnega monitoringa kazalnika Pretok genov/sistem opravevanja, ki se izvaja samo na **napredni ravni**, je približno **7.000 EUR in 160 delovnih ur**.

8.4 Informativna vrednost verifikatorjev GGM

Visoko informativno vrednost smo dodelili trem verifikatorjem: Obilnost mladja (osnovna, standardna in napredna raven, kazalnik Selekcija), Efektivna velikost populacije (standardna in napredna raven, kazalnik Genetska variabilnost) in Dejanska stopnja opravevanja med sorodniki (napredna raven, kazalnik Pretok genov/sistem opravevanja). Ti trije verifikatorji nam neposredno sporočajo, da lahko pričakujemo zmanjšanje opazovane populacije in da so potrebni takojšnji ukrepi pri gospodarjenju z gozdom. Če ni naravnega mladja, se sestoj ne bo obnovil. Če se efektivna velikost populacije zelo zmanjša, je lahko število starševskih dreves, ki prispevajo k naslednji generaciji, prenizko za ohranjanje genetske variabilnosti v opazovani populaciji. Če se dejanska stopnja opravevanja med sorodniki (kombinacija informacij o markerjih in lastnostih semen) zelo zviša, lahko to povzroči fiksacijo alelov in zmanjšanje genetske raznolikosti.

Vsem drugim verifikatorjem smo pripisali srednjo informativno vrednost. Posamično jih težko razlagamo, če pa jih obravnavamo skupaj, omogočajo popolnejši pregled nad stanjem opazovane populacije. Zagotavljajo tudi informacije, ki so nam v pomoč pri razlagi treh verifikatorjev z visoko informativno vrednostjo.

Vsem dodatnim informacijam smo pripisali nizko informativno vrednost. Vseeno pa so ključne za razlago verifikatorjev, tako tistih s srednjo kot tistih z visoko informativno vrednostjo.

8.5 Ukrepi pri gospodarjenju po opravljenem GGM

Glede na trend vrednosti verifikatorjev se lahko odločimo za dvig ravni monitoringa z osnovne na standardno ali napredno raven, da poiščemo razloge za opažene trende, ali uvedbo različnih ukrepov pri gospodarjenju z gozdom. Med njimi morajo biti gozdnogojitveni ukrepi, ki spodbujajo dinamične genetske procese za izboljšanje prilagajanja in ohranjanje genetske raznolikosti (Koskela in sod. 2013), zlasti **vzdrževanje ali povečanje števila razmnoževalno aktivnih dreves in preživetja mladja**, na primer z vzpostavitvijo zadostnih svetlobnih pogojev, odstranjevanjem/nadzorom podrasti in plevela, pripravo površin za nasemenitev ali preprečevanjem požarov ter nadzorom nad rastlinojedimi živalmi, vključno z ograjevanjem. Redčenje je koristno, vendar ne sme preveč zmanjšati števila razmnoževalno aktivnih dreves (efektivne velikosti populacije). Pri redčenju obdržimo drevesa s čim bolj raznoliko fenologijo cvetenja in olistanja (tj. drevesa, ki se olistajo zgodaj in pozno). Čeprav naj bi bila po splošno sprejetem prepričanju efektivna velikost populacije 50 ali več dreves dovolj za ustavitev zmanjševanja fitnesa populacije, novejši viri o ohranjanju gozdov spodnjo vrednost postavljajo višje, pri 100 drevesih (Frankham in sod. 2014). Ko je efektivna velikost populacije enaka ali večja od 100, izguba skupnega fitnesa po petih generacijah ostaja manjša od 10 %, medtem ko mora biti za stalno ohranjanje evolucijskega potenciala za reproduktivno sposobnost efektivna velikost populacije 1.000 ali več (Frankham in sod. 2014). Hoban in sod. (2020) kot efektivno velikost populacije, pod katero je populacija manj sposobna za prilagajanje na okoljske spremembe, navajajo število 500.

8.6 Sporočila odločevalcem

Gozdni genski viri ne poznajo mej. Za podpiranje, ohranjanje, upravljanje in izrabo gozdnih genkih virov moramo stremeti k regionalnemu sodelovanju.

Okoljske spremembe in kakršni koli gozdnogospodarski ukrepi lahko vplivajo na genetsko raznolikost. Največji neposredni vpliv na prihodnje generacije gozdnih dreves imajo trenutna hitrost podnebnih sprememb in gozdarski posegi.

Genetski monitoring je potreben za zagotavljanje informacij za trajnostno gospodarjenje z gozdovi. Genetski monitoring je edino orodje za sledenje prilagajanja dreves na spreminjajoče se razmere znotraj areala in na njegovih robovih, ne glede na to, ali so populacije nastale naravno ali s setvijo in sajenjem gozdnega reprodukcijskega materiala. Daje nam neprecenljive informacije za trajnostno gospodarjenje z gozdovi.

Genetski monitoring lahko prilagodimo vprašanjem, na katera želimo odgovoriti, in razpoložljivim finančnim sredstvom. Genetski monitoring lahko v praksi izvajamo na osnovni, standardni in napredni ravni. Izbira ravni je odvisna od opazovane populacije, zastavljenih vprašanj in želene stopnje natančnosti, pa tudi od finančnih sredstev, človeških virov in strokovnega znanja, ki so nam na voljo.

Za izvajanje genetskega monitoringa je ključno sodelovanje. Izvajanje genetskega monitoringa zahteva sodelovanje med gozdarji in raziskovalci s potrebnim strokovnim znanjem.

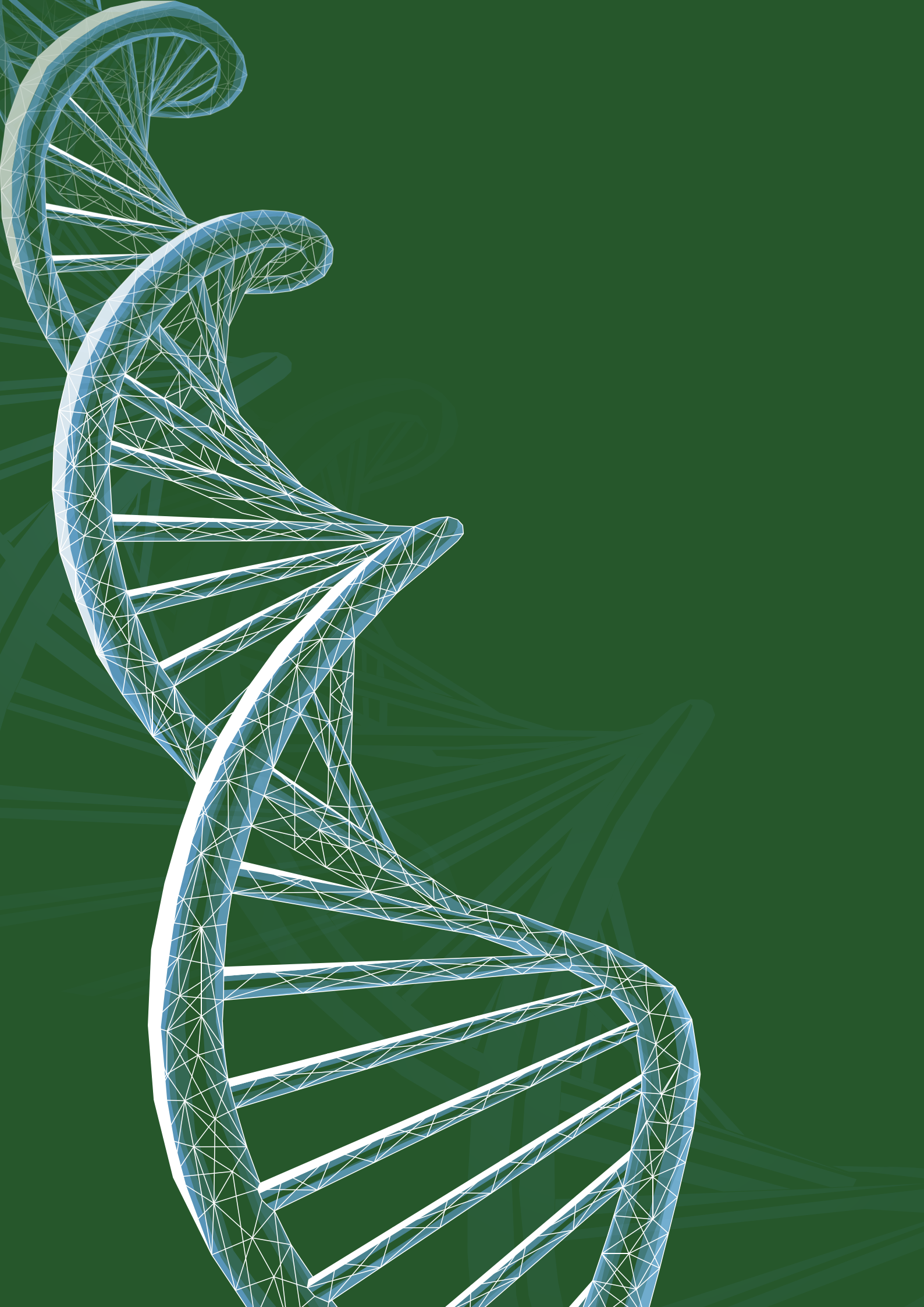
Dolgoročno shranjevanje izhodiščnih vzorcev tkiv in podatkov je za monitoring nujno. Da bi gozdni genetski monitoring dosegel svoj polni potencial, potrebujemo prostore za dolgoročno shranjevanje vzorcev tkiv in/ali DNK ter podatkov. Dostopnost vzorcev DNK skozi vsa leta trajanja monitoringa laboratorijem omogoča ponovno analizo vseh vzorcev – od »časa nič« naprej – na primer, ko postanejo dostopni naprednejši pristopi k analizi DNK, ki dajejo več informacij. Prostori za shranjevanje so lahko centralizirani ali organizirani na državni ravni.

Prenos gozdnega reprodukcijskega materiala znotraj regije lahko podpre prilagoditev gozdov na prihodnja podnebja in spreminjajoče se okolje. Gozdni genski viri iz sosednjih držav in regij na območjih podnebnij, kakršna pričakujemo v prihodnosti, lahko pripomorejo k vzdržnosti in odpornosti gozdov, če jih uporabimo za dopolnilno sadnjo z gozdnim reprodukcijskim materialom.

Prenos gozdnega reprodukcijskega materiala čez državne meje mora upoštevati zakonske pogoje. Zakonski pogoji za uporabo gozdnega reprodukcijskega materiala iz drugih držav in zakonski pogoji za čezmejni prenos gozdnega reprodukcijskega materiala iz držav, ki niso članice EU oziroma OECD, morajo biti izpolnjeni. Na državnem ozemlju mora biti vzpostavljena strokovna svetovalna služba za podporo pri odločitvah za uporabo gozdnega reprodukcijskega materiala iz gozdnih genkih virov tujih držav.

Viri

- Frankham R, Bradshaw CJA, Brook BW (2014) Genetics in conservation management: Revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. *Biol Conserv* 170:56-63. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2013.12.036>
- Hoban S, Bruford M, Jackson DJ et al (2020) Genetic diversity targets and indicators in the CBD post-2020 Global Biodiversity Framework must be improved. *Biol Conserv* 248:108654. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108654>
- Koskela J, Lefèvre F, Schueler S, Kraigher H, Olrik DC, Hubert J, et al (2013) Translating conservation genetics into management: pan-European minimum requirements for dynamic conservation units of forest tree genetic diversity. *Biol Conserv* 157:39-49. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2012.07.023>





LIFE13 ENV/SI/000148

Priročnik za gozdni genetski monitoring

poglavje 9

Smernice za gozdni genetski monitoring

Darius KAVALIAUSKAS¹, Marjana WESTERGRENN², Paraskevi ALIZOTI³, Gregor BOŽIČ², Barbara FUSSI¹, Kristina SEVER⁴, Andrej BREZNIKAR⁴, Marko BAJC², Filippos A. ARAVANOPOULOS³, Dalibor BALLIAN^{2,5}, Evangelos BARBAS³, Sándor BORDÁCS⁶, Rok DAMJANIČ², Natalija DOVČ², Domen FINŽGAR^{2,7}, Berthold HEINZE⁸, Fotios KIOURTSIS⁹, Monika KONNERT¹, Nikolaos TOURVAS³, Zvonimir VUJNOVIĆ¹⁰, Peter ŽELEZNIK², Hojka KRAIGHER²

Navedba: Kavaliauskas in sod. (2020) Smernice za gozdni genetski monitoring. V: Bajc in sod. (ur.) Priročnik za gozdni genetski monitoring. Gozdarski inštitut Slovenije: Založba Silva Slovenica, Ljubljana, str. 159–290. <http://dx.doi.org/10.20315/SFS.168>

Povezane ustanove:

1. Bavarski urad za gozdno genetiko (AWG), Nemčija
2. Gozdarski inštitut Slovenije (GIS), Slovenija
3. Aristotelova univerza v Solunu (AUTh), Grčija
4. Zavod za gozdove Slovenije (ZGS), Slovenija
5. Univerza v Sarajevu, Fakulteta za gozdarstvo, Bosna in Hercegovina
6. Univerza Szent István, Budimpešta, Madžarska
7. Inštitut za evolucijsko biologijo, Univerza v Edinburgu, Združeno kraljestvo
8. Avstrijski zvezni raziskovalni center za gozdove (BFW), Avstrija
9. Decentralizirana uprava Makedonije in Trakije, Generalni direktorat za gozdarstvo in podeželje, Grčija
10. Hrvaški gozdarski inštitut, Jastrebarsko, Hrvaška

9.1 Uvod

Smernice za gozdni genetski monitoring sedmih tarčnih drevesnih vrst in kompleksov vrst (kompleks bele in Borisove jelke (*Abies alba* Mill./*Abies borisii-regis* Mattf.), navadna bukev (*Fagus sylvatica* L.), veliki jesen (*Fraxinus excelsior* L.), črni bor (*Pinus nigra* J. F. Arnold), evropski črni topol (*Populus nigra* L.), divja češnja (*Prunus avium* (L.) L.), kompleks gradna in doba (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl./*Quercus robur* L.)) so bile pripravljene v okviru projekta LIFE GENMON, da bi se olajšala vzpostavitev in izvajanje genetskega monitoringa teh vrst na evropski ravni. Smernice vsebujejo jedrnatte napotke za izbiro, vzpostavitev in vzdrževanje ploskev za gozdni genetski monitoring ter popis vseh terenskih verifikatorjev (npr. mortalitete/preživetja, cvetenja, obroda, obilnosti mladja) in dodatnih informacij (npr. porazdelitve debelinskih razredov, porazdelitve višinskih razredov, olistanja, senescence) za sedem omenjenih drevesnih vrst ali kompleksov vrst na različnih ravneh monitoringa (osnovni, standardni in napredni). Smernice so osredotočene na specifičnost genetskega monitoringa posameznih drevesnih vrst ali kompleksov vrst (Preglednica 9.1), pri čemer se upoštevajo njihova biologija (sistem opravevanja/razmnoževalni sistem, ekologija itd.), njihova razširjenost (manjšinska ali sestojna vrsta) ter njihova specifična ekonomska in ekološka vrednost. Izbrane vrste torej predstavljajo širok nabor bioloških in ekoloških značilnosti ter vidikov ohranjanja, zato so te smernice, čeprav napisane specifično za izbrane vrste, primerne za širšo uporabo v evropskem gozdarstvu, ki presega teh sedem vrst. Smernice za gozdni genetski monitoring navadne bukve (*Fagus sylvatica* L.) in kompleksa bele in Borisove jelke (*Abies alba* Mill./*Abies borisii-regis* Mattf.) so bile pripravljene na podlagi rezultatov in izkušenj, pridobljenih pri dejanskem genetskem monitoringu teh vrst, ki je bil izveden v okviru projekta LIFE GENMON v Nemčiji, Sloveniji in Grčiji. Skupno je bilo vzpostavljenih šest ploskev za gozdni genetski monitoring – tri za navadno bukev, dve za belo jelko in ena za borisovo jelko. Zgoraj navedene testne ploskve bodo ostale na voljo za izvajanje genetskega monitoringa in raziskav tudi v bodoče.

V splošnem se pričakuje, da bodo smernice za gozdni genetski monitoring sedmih izbranih vrst in kompleksov vrst prispevale k vzpostavitvi mreže ploskev za genetski monitoring širom Evrope za zgodnjo oceno vplivov podnebnih sprememb na genetsko variabilnost populacij gozdnih dreves, da bo mogoče pravočasno, učinkovito in uspešno uvesti ustrezne ukrepe pri gospodarjenju z gozdom.

Te smernice so zlasti namenjene osebjem, ki opravljajo terensko delo, povezano z gozdnim genetskim monitoringom, in vključujejo podrobna navodila za izvedbo rednih terenskih opazovanj in meritev za tak monitoring, kot so fenološka opazovanja, ocena mortalitete/preživetja, ocena obilnosti mladja itd. Za zagotavljanje primerljivosti rezultatov, ki jih v različnih letih pridobi različno osebje, ki izvaja opazovanja, morajo biti terensko delo in tehnike zbiranja podatkov standardizirani. Po ustrezni pripravi in usposabljanju lahko terenska opazovanja izvedejo terenski tehniki, gozdarji ali znanstveniki. Ker so številna opazovanja na terenu odvisna od vizualne ocene in, vsaj v določeni meri, od interpretacije posameznika, se priporoča organizacija usposabljanj o postopkih izvedbe terenskih opazovanj, da se zagotovi kar najvišja raven primerljivosti in zanesljivosti zbranih podatkov.

Preglednica 9.1: Seznam vrst, za katere so bile pripravljene smernice za gozdni genetski monitoring v okviru projekta LIFE GENMON. Vseh sedem izbranih vrst/kompleksov vrst velja za ekološko in ekonomsko pomembne. Ohranitveni status – IUCN (v skladu z rdečim seznamom IUCN za Evropo): LC – najmanj ogrožena vrsta, NT – potencialno ogrožena vrsta, DD – premalo podatkov, NE – neobravnavana vrsta; populacijski trend (v skladu z rdečim seznamom IUCN za Evropo): — – stabilna populacija, ↓ – upadajoča populacija, ? – trend neznan, NE – neobravnavana vrsta; razširjenost: SV – sestojna vrsta, MV – manjšinska vrsta; razvrstitev: L – listavec, I – iglavec; oprašitev: V – vetrocvetka, Ž – žužkocvetka; enodomnost oziroma dvodomnost: E – enodomne vrste, D – dvodomne vrste.

Vrsta	Ohranitveni status - IUCN	Populacijski trend	Razširjenost	Razvrstitev	Oprašitev	Enodomna/dvodomna
<i>Fagus sylvatica</i>	LC ¹	— ¹	SV	L	V	E
<i>Abies alba/</i> <i>Abies borisii-regis</i>	LC ¹ NE	— ¹ NE	SV	I	V	E
<i>Populus nigra</i>	DD ³	↓ ³	MV	L	V	D
<i>Fraxinus excelsior</i>	NT ⁴	↓ ⁴	SV/MV*	L	V	E
<i>Pinus nigra</i>	LC ⁵	— ⁵	SV	I	V	E
<i>Prunus avium</i>	LC ⁶	— ⁶	MV	L	Ž	E
<i>Quercus robur/</i> <i>Quercus petraea</i>	LC ⁷ LC ⁸	↓ ⁷ ? ⁸	SV	L	V	E

* Veliki jesen lahko tvori čiste sestoje, vendar pogosteje raste v manjših skupinah dreves v mešanih sestojih, podobno manjšinskim vrstam.

Viri za preglednico

1. Barstow M, Beech E (2018) *Fagus sylvatica*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2018: e.T62004722A62004725. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-1.RLTS.T62004722A62004725.en> Pridobljeno 04 December 2020
2. Farjon, A (2017) *Abies alba*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2017: e.T42270A83978869. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-2.RLTS.T42270A83978869.en> Pridobljeno 04 December 2020
3. Harvey-Brown Y, Barstow M, Mark J & Rivers, MC (2017) *Populus nigra*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2017: e.T63530A68106816 <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T63530A68106816.en> Pridobljeno 04 december 2020
4. Khela S & Oldfield S (2018) *Fraxinus excelsior*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2018: e.T203367A67807718. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-1.RLTS.T203367A67807718.en> Pridobljeno 04 december 2020
5. Farjon A (2013) *Pinus nigra*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2013: e.T42386A2976817. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T42386A2976817.en> Pridobljeno 04 december 2020
6. Rivers MC (2017) *Prunus avium*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2017: e.T172064A50673544. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T172064A50673544.en> Pridobljeno 04 december 2020
7. Gorener V, Khela S & Barstow M (2017) *Quercus petraea*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2017: e.T62539A3116237. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T62539A3116237.en> Pridobljeno 04 december 2020
8. Barstow M & Khela S (2017) *Quercus robur*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2017: e.T63532A3126467. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T63532A3126467.en> Pridobljeno 04 december 2020

9.2 Smernice za izbranih sedem vrst

Smernice za gozdni genetski monitoring

9.2.1 **bele jelke** **(*Abies alba* Mill.)** **in** **Borisove jelke** **(*Abies borisii-regis* Mattf.)**

Darius KAVALIAUSKAS¹, Barbara FUSSI¹, Dalibor BALLIAN^{2,3},
Paraskevi ALIZOTI⁴, Nikolaos TOURVAS⁴, Gregor BOŽIČ², Evangelos BARBAS⁴,
Marjana WESTERGREN², Marko BAJC², Rok DAMJANIČ², Natalija DOVČ²,
Filippos A. ARAVANOPOULOS⁴, Hojka KRAIGHER²

Ilustracije: Anja RUPAR



Navedba: Kavaliauskas in sod. (2020) Smernice za gozdni genetski monitoring bele jelke (*Abies alba* Mill.) in Borisove jelke (*Abies borisii-regis* Mattf.). V: Bajc in sod. (ur.) Priročnik za gozdni genetski monitoring. Gozdarski inštitut Slovenije: Založba Silva Slovenica, Ljubljana, str. 163-178. <http://dx.doi.org/10.20315/SFS.168>

Povezane ustanove:

1. Bavarski urad za gozdno genetiko (AWG), Nemčija
2. Gozdarski inštitut Slovenije (GIS), Slovenija
3. Univerza v Sarajevu, Fakulteta za gozdarstvo, Bosna in Hercegovina
4. Aristotelova univerza v Solunu (AUTH), Grčija

1 Povzetek

Bela jelka ali navadna jelka, tudi hoja, (*Abies alba* Mill.) in Borisova jelka (*Abies borisii-regis* Mattf.) sta vetrocvetni, enodomni, običajno alogamni iglasti drevesni vrsti iz rodu *Abies*. Bela jelka je v več evropskih državah z ekonomskega in ekološkega vidika ena izmed najpomembnejših gozdnih drevesnih vrst. Borisova jelka je pomemben naravni hibrid med belo (*Abies alba*) in grško jelko (*Abies cephalonica* Loudon), ki raste zlasti v Grčiji, Severni Makedoniji in Bolgariji. Zaradi velikega ekološkega in tudi ekonomskega pomena in dejstva, da sta obe vrsti izpostavljeni številnim ogrožujočim dejavnikom zaradi podnebnih sprememb, bi bilo za obe priporočljivo uvesti gozdni genetski monitoring (GGM).

V teh smernicah sta na kratko opisani bela in Borisova jelka, njun razmnoževalni sistem, okoljske zahteve in nevarnosti. Smernice vsebujejo tudi napotke za vzpostavitev in vzdrževanje ploskve za GGM ter popis vseh terenskih verifikatorjev in dodatnih informacij na osnovni, standardni in napredni ravni monitoringa.



Slika 1: (a) Habitua bele jelke; (b) mladika bele jelke/Borisove jelke; (c) veja z iglicami Borisove jelke; (d) veja z iglicami bele jelke.

2 Opis vrste

Bela jelka in Borisova jelka (Slika 1) sta enodomni iglasti drevesni vrsti, ki lahko v optimalnih pogojih zrasteta več kot 50 (60) m visoko in do debeline (prsnega premera) več kot 1,5 (2,0) m [1, 4, 16, 28]. Zaradi upočasnjene rasti vrhnjega poganjka starejša drevesa izgubijo stožčasto obliko in na vrhu postanejo ovalna. V lesu ni smole in jedrovina ni obarvana. Veje so v vretencih in ne visijo, ampak večinoma izraščajo vodoravno in so bolj ali manj ploske. Lubje je gladko do starosti 50 let. Pri višji starosti razpoka v oglate plutaste luske, ki ostanejo pritrjene na drevo in jih je težko odtrgati [1, 4, 7, 26, 27, 28]. Iglice bele jelke so na zgornji strani temno zelene in bleščeče, na spodnji strani pa imajo dve voskasti srebrno zeleni progi s 6–8 vrstami listnih rež [16, 28].

3 Razmnoževanje

Bela in Borisova jelka sta vetrocvetna, enodomna, običajno alogamna iglavca s številom kromosomov $2n = 24$. Ženski cvetovi so na koncu najvišjih vej in imajo obliko majhnih storžev. Moški cvetovi so običajno nekoliko nižje v krošnji, v pazduhah iglic, v obliki mačic. Moški cvetovi so dolgi približno 2 cm in imajo dve pelodni vrečki. Bela jelka cveti spomladi, od aprila do junija, odvisno od nadmorske višine in zemljepisne širine. Pri obeh vrstah seme raznaša veter [1, 4, 7, 26, 27, 28].

Jelke so dolgožive, razmnoževalno sposobnost lahko dosežejo pri starosti 20 let, povprečno pa pri starosti 60 let [14]. Ženska storžasta socvetja so v mladosti temno zelena in jajčaste oblike, dolga približno 2 cm in pokončna. Zrel storž je rumenkasto do temno rjav, valjast, dolg do 16 cm in širok do 5 cm. Storži na vejah vedno stojijo pokonci in še v istem letu razpadejo. Oktobra začnejo odpadati luske s semeni, na veji pa ostane golo storževno vreteno. Krilata semena raznese veter. Mlada drevesa obrodijo vsaki dve leti, stara in višje rastoča drevesa pa redkeje, na tri ali več let [1, 4, 7, 26, 27, 28]. Nekatera drevesa lahko obrodijo tudi vsako leto (opazanja pri projektu LIFE GENMON na ploskvi za GGM bele jelke na jugu Nemčije).

Kljub veliki količini proizvedenega peloda štejemo belo jelko med šibkejše proizvajalke semena, saj se le malo brstov razvije v ženske cvetove. Poleg tega semenitev drastično zmanjšujejo napadi žuželk, pozna pozeba, običajno maja in zgodaj junija, odvisno od nadmorske višine [8, 10], in nezadostno opráševanje [6, 15, 17, 18, 19, 20, 23, 24, 25]. Celotni cikel od cvetenja do dozorevanja storžev in raztrosa semen se odvije v enem letu. Obdobje od cvetenja in oprášitve do dozorevanja semen traja od 90 do 120 dni [3, 9, 12, 13, 29]. Seme bele jelke dozori in se raztroši iz storžev med septembrom in novembrom, odvisno od lokalnih razmer.

4 Okolje

Bela jelka je razširjena po srednji Evropi ter v nekaterih delih vzhodne in južne Evrope [4, 26, 27, 28]. Razširjenost Borisove jelke je omejena na južni del Balkana. Bela jelka uspeva v zmernem celinskem podnebju, ki ga blaži vpliv morja. V nasprotju z drugimi sredozemskimi vrstami iz rodu *Abies* bolje uspeva v hladnejših in bolj vlažnih razmerah. Dobro prenaša različne talne tipe z različno vsebnostjo hranil in alkalnostjo, razen zbitih in hidromorfni tal [16]. Najustreznejša so globoka in vlažna, toda ne premokra tla, s kislim ali nevtralnimi pH. Bela jelka je zelo sencozdržna drevesna vrsta in lahko zelo dolgo obstane v močno zastrtim prebiralnem gozdu [16, 28]. Lahko tvori čiste sestoje, vendar jo običajno najdemo v mešanih sestojih z navadno smrekovo (*Picea abies* (L.) Karst.) ali rdečim borom (*Pinus sylvestris* L.) na zgornji gozdni meji, v nižjih legah pa lahko raste skupaj z navadno bukvijo (*Fagus sylvatica* L.) [1, 16, 28, 4 ter tam navedeni viri].

5 Ogroženost

Bela jelka je občutljiva na temperaturne razmere, saj je mladje dovzetna za pozno-spomladansko pozebo [21]. Do starosti treh let je tudi zelo občutljiva na sušo in ne zmore preživeti daljših sušnih obdobj [1, 4, 22]. Poleg tega je mladje zelo izpostavljeno objedanju divjadi. Bela jelka je občutljiva tudi na gozdne požare in onesnaženje zraka, zlasti z žveplovim dioksidom (SO_2) pozimi [16 ter tam navedeni viri]. Zaradi spreminjajočega se podnebja je bela jelka bolj izpostavljena boleznim in škodljivcem; v Sredozemlju so jo že poškodovali podlubniki in omela, zlasti na območjih, kjer so suše pogostejše [16 ter tam navedeni viri]. Žuželke, kot so osmerozobi smrekov lubadar (*Ips typographus* L.), zelena jelova uš (*Cinara pectinatae* Nördlinger) in *Epinotia nigricana* Herrich-Schäffer, prizadenejo lubje in poganjke bele jelke. Glivi sivorumena mraznica (*Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm agg.) in borov trohnož (*Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref.) povzročata trohno korenin, koreničnika in spodnjega dela debla ter povečata občutljivost na vetrolom [16 ter tam navedeni viri].

6 Vzpostavitev in vzdrževanje ploskve

Bela in Borisova jelka sta sestojni drevesni vrsti, ki lahko tvorita čiste ali mešane gozdne sestoje z navadno smrekjo, rdečim borom, navadno bukvijo in drugimi drevesnimi vrstami [1, 28, 4 ter tam navedeni viri]. Zato za genetski monitoring bele in Borisove jelke tako kot pri drugih sestojnih drevesnih vrstah, npr. navadni bukvi, uporabimo pristop GGM za sestojne vrste. Prvi korak za uspešno vzpostavitev ploskve za GGM je izbira ploskve, ki jo moramo izvesti skladno z merili opisanimi v 2. poglavju Priročnika za gozdni genetski monitoring (npr. večjo prednost dajemo gozdnim sestojem, za katere imamo na voljo že veliko podatkov in natančne informacije o ploskvah) [2].

Gozdni genetski monitoring Borisove jelke (*Abies borisii-regis*) je lahko zaradi geografsko nepovezane porazdelitve, biologije vrste (npr. hibridizacije) in ogrožujočih dejavnikov (npr. podnebnih sprememb, škodljivcev in bolezni) težavnejši, zato lahko velikost in oblika ploskve za GGM za to vrsto odstopata od običajne. Velikost in zasnovano ploskve za GGM zato prilagodimo glede na lokalne razmere, vendar je priporočljivo, da ploskev ni večja od 10 ha.

Ploskev za GGM obsega 50 razmnoževalno aktivnih dreves, ki so drugo od drugega oddaljena najmanj 30 m. Če drevo cveti, ga obravnavamo kot razmnoževalno aktivno. Če ploskev vzpostavljamo izven časa cvetenja, lahko za prepoznavanje razmnoževalno aktivnih dreves uporabimo prsni premer in socialni položaj drevesa, pri čemer se opiramo na strokovno znanje revirnega gozdarja. Pri postavljanju ploskve moramo drevesa označiti in zapisati njihove koordinate. Hkrati lahko izmerimo prsni premer in odvezamo vzorce za ekstrakcijo DNK.

Poleg tega mora biti na območju GGM prisotno dovolj gosto naravno mladje.

Potrebna oprema:

- naprava za merjenje razdalje (priporoča se daljnogled z laserskim daljinomerom),
- kompas,
- barva s čopičem ali pršilko za označevanje dreves,
- premerka za merjenje prsnega premera,
- naprava GPS, ki je dovolj natančna in omogoča shranjevanje koordinat dreves.

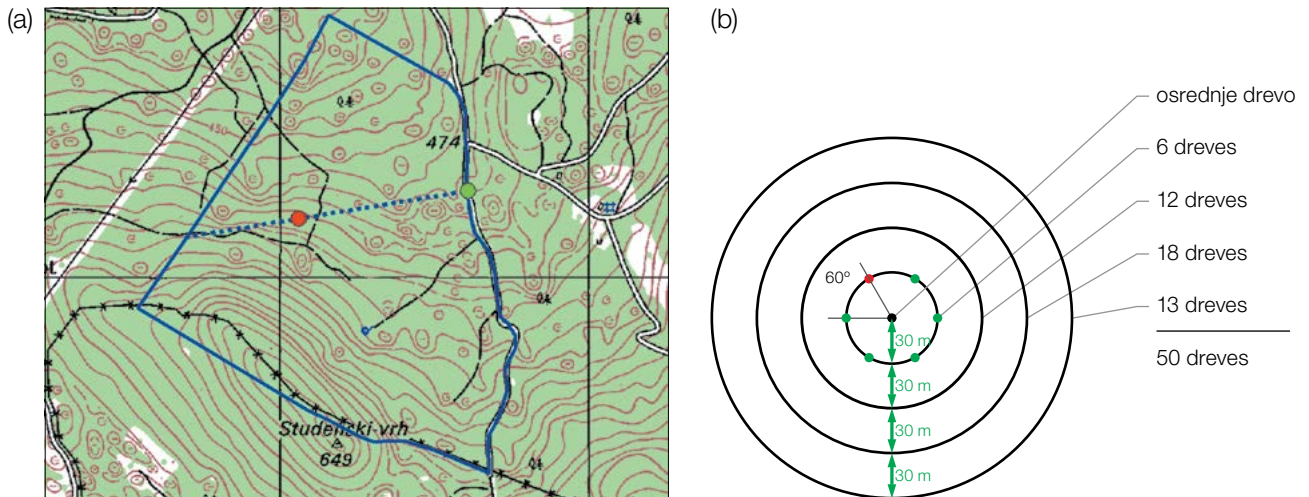
6.1 Vzpostavitev ploskve

6.1.1 Izbira središča ploskve

Splošni postopek za naključno izbiro središča ploskve obsega sledeče korake (Slika 2a):

- naključna izbira točke (zelena pika na Sliki 2a) na zemljevidu na gozdni cesti ali poti, ki poteka ob sestoju,
- risanje črte, ki je približno pravokotna na cesto, iz prej omenjene naključno izbrane točke na cesti,
- naključna izbira točke na pravokotnici (rdeča pika na Sliki 2a) – ta točka je središče ploskve za GGM

Najmanjša razdalja med izbrano središčno točko in mejo sestoja mora biti vsaj 150 metrov. Če izbrana središčna točka ne ustreza tej zahtevi, je treba poiskati novo točko ob upoštevanju zgoraj opisanega postopka.



Slika 2: Naključna izbira središča ploskve za gozdni genetski monitoring (a); izbira dreves okoli predhodno izbranega osrednjega drevesa v koncentričnih krogih s polmeri, ki se povečujejo za 30 metrov (b).

Namesto postopka, opisanega zgoraj, lahko uporabimo tudi orodja za ustvarjanje naključnih točk v programski opremi GIS.

Koordinate izbrane točke shranimo v napravi GPS, ki jo bomo uporabili na terenu.

6.1.2 Vzpostavitev ploskve na terenu

Razmnoževalno aktivno drevo, ki je na terenu najbližje shranjenim koordinatam GPS, postane središče ploskve za monitoring in se označi s številko 1.

Ostala drevesa se izberejo okoli osrednjega drevesa v koncentričnih krogih s polmeri, ki se povečujejo za 30 metrov (Slika 2b). Prvo drevo v vsakem od krogov izberemo naključno, kar lahko naredimo na različne načine: z naključnim azimutom (Preglednica 1), določenim od osrednjega drevesa, s pomočjo smeri sekundnega kazalca na analogni uri ali s katerim koli drugim pristopom, ki omogoča nepristransko izbiro. Preostala drevesa v vsakem od krogov izberemo z ustreznim povečanjem azimuta in upoštevanjem razdalje, ki mora biti vsaj 30 metrov med katerima koli izbranimi drevesoma:

- +60° za prvi krog,
- +30° za drugi krog,
- +20° za tretji krog,
- +15° za četrti krog.

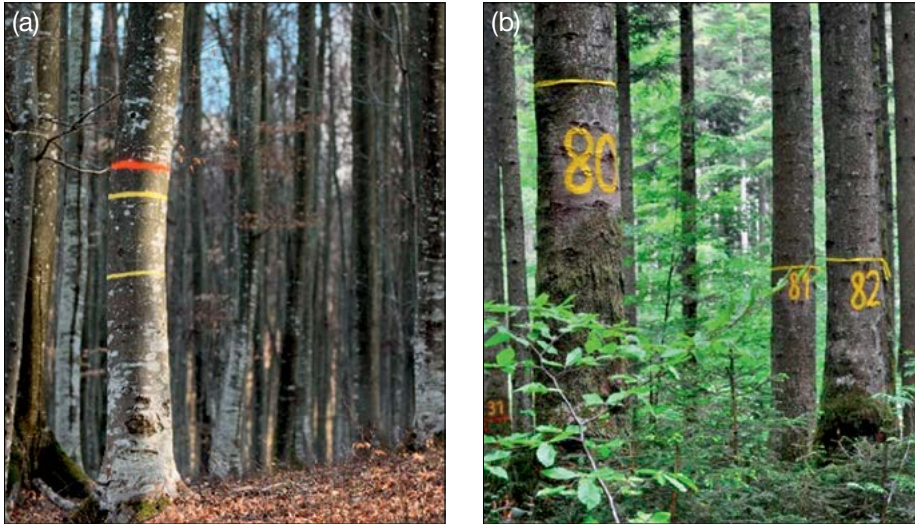
Če v notranjih treh krogih (Slika 3b) ni mogoče najti šestih, dvanajstih in osemnajstih dreves, izberemo dodatna drevesa v zunanem krogu. Zapisati moramo tudi koordinate vsakega drevesa (potrebujemo GPS).

Preglednica 1: Naključno določeni azimuti, ki jih lahko uporabimo za izbiro prvega drevesa v vsakem od krogov.

108	15	186	35	178	29	305	351	44	150
232	23	160	141	112	292	216	83	245	214
63	65	345	234	95	78	279	323	40	236
201	313	275	144	182	68	268	289	185	92
356	177	93	1	145	198	287	251	224	142

6.1.3 Označevanje dreves

Vseh 50 izbranih dreves moramo označiti z ustrezno številko (od 1 do 50) in po možnosti z barvnim obročem okoli debla za večjo vidnost iz vseh smeri. Številke, dodeljene v postopku izbire odraslih dreves, morajo ostati enake skozi celotno obdobje monitoringa. Osrednje drevo (številka 1) lahko označimo z dvema ali več obroči, da se bo razlikovalo od drugih dreves (Slika 3a). S številko je priporočljivo označiti drevo na tisti strani, ki gleda stran od osrednjega drevesa, saj tako lažje najdemo osrednje drevo, zlasti če stojimo ob zunanjih krogih ploskve (Slika 3b).



Slika 3: (a) Osrednje drevo na ploskvi za genetski monitoring označimo z več obroči, da se razlikuje od drugih dreves; (b) izbrana drevesa so označena tako, da številke gledajo stran od osrednjega drevesa. (Na fotografijah je primer označevanja dreves na ploskvah za GGM navadne bukve [levo] in bele jelke [desno].)

6.2 Vzpostavitev podploskev za monitoring mladja

Vzpostavitev podploskev z mladjem se opravi v času kalitve po močnem ali masivnem obrodu.

Naravna pomladitvena jedra iz zadnjega semenskega leta na terenu popišemo in zabeležimo njihove lokacije (koordinate GPS, številka drevesa, ki je najbližje pomladitvenemu jedru). Med vsemi popisanimi pomladitvenimi jedri jih naključno izberemo 20 za vzpostavitev podploskev za monitoring. Če je naravnih pomladitvenih jeder 20 ali manj, uporabimo vsa.

Znotraj vsakega naravnega pomladitvenega jedra postavimo podploskev za monitoring mladja s površino 1 m², ki jo označimo s kovinskimi palicami. Palice na vsakem oglišču podploskve z mladjem zapičimo v tla, kolikor je mogoče globoko, da jih ne bi odstranile živali. Vrhove palic za boljšo vidnost pobarvamo.

6.3 Vzdrževanje ploskve

6.3.1 Splošno vzdrževanje

Označbe dreves in podploskev redno (vsaki dve leti) pregledujemo in po potrebi obnovimo.

6.3.2 Nadomeščanje dreves

Če opazovano drevo odmre ali se v okviru gospodarjenja poseka, ga moramo nadomestiti. Izberemo ustrezno drevo, ki je najbližje odmrlemu in izpolnjuje zahtevo po najmanjši oddaljenosti od najbližjega opazovanega drevesa 30 m. Če to ni mogoče, izberemo drevo z obrobja (najbolje v zunanjem krogu) ploskve za GGM. Nadomestno drevo označimo z naslednjo prosto številko, višjo od 50, tj. 51, 52, 53 itd., da ga lahko jasno ločimo od prvotno izbranih 50 dreves.

Če ima drevo poškodovano krošnja, na primer zaradi vetroloma, žledoloma ali snegoloma, a lahko še obrodi, ga v monitoringu obdržimo. Vzrok poškodbe je treba zabeležiti, saj lahko poškodba vpliva na ugotovljene vrednosti verifikatorjev in dodatnih informacij, ki jih popisujemo na terenu. Če je škoda prehuda in obrod ni več pričakovan, moramo opazovano drevo nadomestiti.

7 Popis verifikatorjev in dodatnih informacij

Verifikatorje in dodatne informacije na ploskvi za GGM redno popisujemo. Z verifikatorji spremljamo genetske lastnosti populacije ter njeno prilagajanje okoljskim spremembam in/ali upravljanju okolja, dodatne informacije pa popisujemo za lažje tolmačenje verifikatorjev.

Pri popisu verifikatorjev na višjih ravneh (standardna, napredna) moramo popisati tudi podatke za nižje ravni (osnovna, standardna). Pri popisu dodatnih informacij to ni potrebno.

Preglednica 2: Seznam verifikatorjev in dodatnih informacij s kratkim opisom in pogostostjo opazovanja za terensko popisovanje na ploskvah za monitoring vrst iz rodu *Abies*.

Ime	Osnovna raven	Standardna raven	Napredna raven	
Verifikatorji	Mortaliteta/ preživetje	Odrasla drevesa: štetje preostalih označenih dreves vsakih 10 let in po vsakem ekstremnem vremenskem pojavu/motnji	Enaka kot osnovna raven	Enaka kot osnovna raven
		Naravno mladje: /	Štetje preostalega mladja na podploskvah za monitoring mladja, dvakrat na desetletje	Enaka kot standardna raven
	Cvetenje	Ocena na ravni sestoja, vsako leto	Opazovanje na ravni posameznih dreves ob dveh obilnih cvetenjih na desetletje, najbolje v enakomernih časovnih razmikih*	Kot standardna raven, vendar se dodatno popisujejo tudi faze razvoja ženskih in moških cvetov*
	Obrod	Ocena na ravni sestoja, vsako leto	Opazovanje na ravni posameznih dreves, v istem letu kot ocena cvetenja na standardni ravni (ne glede na jakost obroda)*	Štetje plodov, v istem letu kot ocena cvetenja na napredni ravni, ne glede na jakost obroda* Za vsak ocenjeni obrod naberemo tudi semena za laboratorijske analize
	Obilnost mladja	Ocena na ravni sestoja, vsako leto	Štetje mladja ustrezne starosti na podploskvah z mladjem v 1. in nato v 6. letu po vsakem ocenjenem obrodu	Štetje mladja ustrezne starosti na podploskvah z mladjem v 1. in nato v 6., 11. in 16. letu po vsakem ocenjenem obrodu
Dodatne informacije	Porazdelitev debelinskih razredov	/	Meritev vsakih 10 let	Enaka kot standardna raven
	Porazdelitev višinskih razredov	/	Meritev vsakih 10 let	Enaka kot standardna raven
	Olistanje	/	Opazovanje na ravni posameznih dreves, vsakih 5 let	Opazovanje na ravni posameznih dreves, vsako leto
	Senescenca	/	Opazovanje na ravni posameznih dreves, vsakih 5 let	Opazovanje na ravni posameznih dreves, vsako leto
	Usklajenost cvetenja	/	/	Opazovanje na ravni posameznih dreves, ob vsakem ocenjenem obilnem cvetenju

* Najbolje je, da vsako desetletje ocenimo vsaj en obilen obrod. Vendar pa vsakemu obilnemu cvetenju ne sledi nujno obilen obrod. Če ocenjenemu cvetenju ne sledi obilni obrod, moramo oceno cvetenja in obroda ponoviti ob naslednjem obilnem cvetenju, ne glede na to, koliko časa preteče med zaporednima obilnima cvetenjema. Obilno cvetenje in obrod prepoznamo z opazovanjem na osnovni ravni.

7.1 Protokoli za popis verifikatorjev

7.1.1 Mortalitet/preživetje

Mortaliteta opisuje mortaliteto odraslih dreves in naravnega mladja. Nasprotni pojem, preživetje, pomeni drevesa, ki so od zadnje ocene še živa. Oba parametra se izražata v relativnih enotah, tj. deležu odmrlih oziroma preživelih dreves. Preživetje izračunamo s formulo $1 - \text{mortaliteta}$.

7.1.1.1 Odrasla drevesa: osnovna, standardna in napredna raven

Verifikator mortaliteta odraslih dreves ocenimo tako, da preštejemo preostala živa označena drevesa vsakih 10 let in po vsakem ekstremnem vremenskem pojavu/motnji. Mortalitet je razlika med začetnim številom označenih dreves in številom še živih dreves izmed prvotnih 50.

7.1.1.2 Mladje: standardna in napredna raven

Mortaliteto mladja izračunamo iz ocen verifikatorja Obilnost mladja (razdelek 7.1.4). Mortalitet je razlika med začetnim številom mladja in številom še živega mladja ob naslednjem štetju. Za vsako ocenjevanje obilnosti mladje najprej preštejemo v letu kalitve in nato 5 let kasneje na standardni ravni, na napredni ravni pa še 10 in 15 let kasneje. Na standardni ravni za vsako ocenjevanje izračunamo mortaliteto po petih letih, na napredni ravni pa še po 10 in 15 letih. Obilnost mladja se ocenjuje dvakrat na desetletje, najbolje približno vsakih pet let.

7.1.2 Cvetenje

Ta verifikator opisuje jakost cvetenja in delež dreves, ki cvetijo. V srednji Evropi ga običajno lahko popišemo od aprila do maja.

7.1.2.1 Osnovna raven

Ta verifikator popišemo vsako leto na ravni sestoja. Popis opravimo, ko je cvetenje v polnem razmahu. Povprečno stanje ocenimo po pregledu celotne ploskve za monitoring. Zabeležimo dva rezultata, enega za jakost cvetenja, izraženo kot povprečni delež krošnje s cvetovi, in drugega za delež cvetočih dreves v sestoji.

Šifra	Jakost cvetenja na ravni sestoja	Povprečni delež krošnje s cvetovi (%)
1	Brez cvetenja: na drevesih ni cvetov ali so cvetovi le ponekod.	0–10
2	Šibko cvetenje: na drevesih je nekaj cvetov.	> 10–30
3	Zmerno cvetenje: na drevesih je zmerno število cvetov.	> 30–60
4	Močno cvetenje: na drevesih je veliko število cvetov.	> 60–90
5	Masivno cvetenje: na drevesih je ogromno število cvetov.	> 90

Šifra	Delež dreves v sestoji z navedeno jakostjo cvetenja (%)
1	0 – 10
2	> 10 – 30
3	> 30 – 60
4	> 60 – 90
5	> 90

6.1.2.2 Standardna raven

Ta verifikator popišemo ob dveh obilnih cvetenjih na desetletje, najbolje v enakomernih časovnih razmikih. Popišemo ga na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves. Cvetenje je obilno, ko je na osnovni ravni ocenjeno kot močno ali masivno (šifra 4 ali 5) in je delež dreves z navedeno stopnjo jakosti cvetenja večji od 60 % (šifra 4 ali 5). Popis opravimo, ko je cvetenje v polnem razmahu. Za vsako drevo navedemo en rezultat.

Šifra	Jakost cvetenja	Delež krošnje s cvetovi (%)
1	Brez cvetenja: na drevesu ni cvetov ali so cvetovi le ponekod.	0–10
2	Šibko cvetenje: na drevesu je nekaj cvetov.	> 10–30
3	Zmerno cvetenje: na drevesu je zmerno število cvetov.	> 30–60
4	Močno cvetenje: na drevesu je veliko število cvetov.	> 60–90
5	Masivno cvetenje: na drevesu je ogromno število cvetov.	> 90

6.1.2.3 Napredna raven

Ta verifikator popišemo ob dveh obilnih cvetenjih na desetletje, najbolje v enakomernih časovnih razmikih. Popišemo ga na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves. Cvetenje je obilno, ko je na osnovni ravni ocenjeno kot močno ali masivno (šifra 4 ali 5) in je delež dreves z navedeno stopnjo jakosti cvetenja večji od 60 % (šifra 4 ali 5). Povprečno sta potrebna dva obiska ploskve; prvi dovolj zgodaj, da opazujemo zgodnje faze cvetenja, in drugi, ko je cvetenje v polnem razmahu.

Za vsako drevo navedemo tri rezultate: fazi ženskega in moškega cvetenja [5] ter delež krošnje s cvetovi. Delež krošnje s cvetovi se nanaša na skupno število cvetov (moški + ženski) na drevesu. Faze cvetenja prikazuje Slika 4.

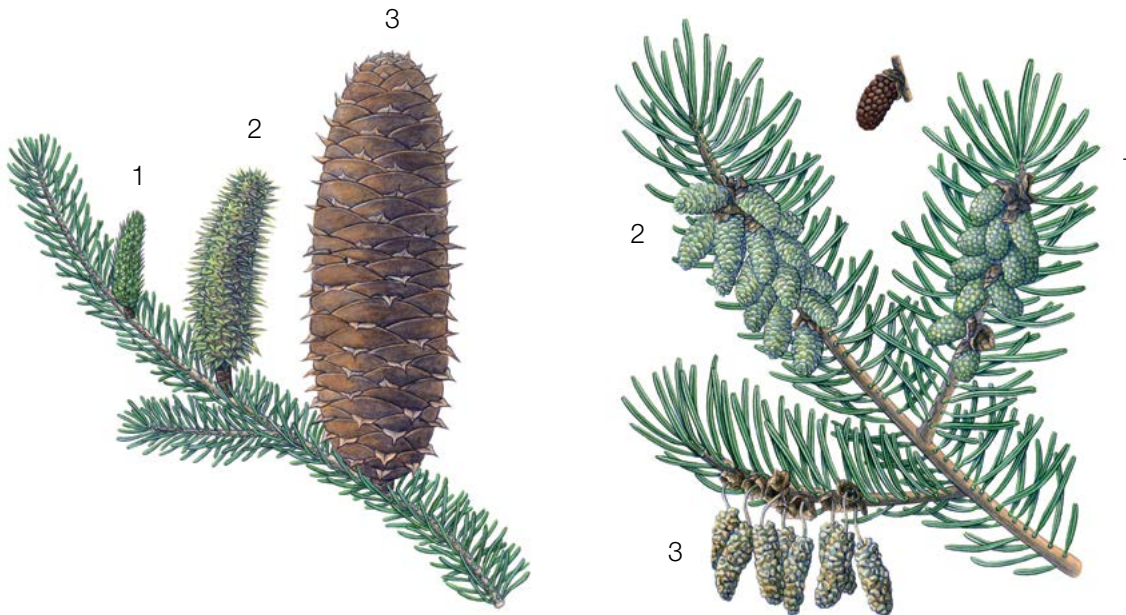
Vsakemu obilnemu cvetenju ne sledi nujno obilen obrod. Če ocenjenemu cvetenju ne sledi obilni obrod, moramo oceno cvetenja in obroda ponoviti ob naslednjem obilnem cvetenju. Obilno cvetenje in obrod prepoznamo z opazovanjem na osnovni ravni.

Šifra	Faza ženskega cvetenja
1	Vidni so storžki (1–2 cm)
2	Dolžinska rast storžkov se je začela
3	Barva storžev se je spremenila iz zelene v rjavkasto

Šifra	Faza moškega cvetenja
1	Mikrosporofili rastejo, vendar so še zaprti in ostajajo zelo blizu veje (barva – zelena/rjava/temno rdeča/rdečkasto rjava)
2	Pelodne vrečke so podaljšane/nabrekle – sproščanje peloda (barva – rumena/temno rdeča/rjava/rdečkasto rjava)
3	Sproščanje peloda je končano, vrečke še visijo na veji, a so prazne (barva – rjava/temno rdeča/rdečkasto rjava)

Šifra	Delež krošnje s cvetovi (%; moški in ženski cvetovi skupaj)
1	0–10
2	> 10–30
3	> 30–60
4	> 60–90
5	> 90

Dodatno informacijo Usklajenost cvetenja lahko ocenimo na podlagi rezultatov za žensko in moško cvetenje, ki jih dobimo za ta verifikator.



Slika 4: Slikovni vodnik za opisovanje faz ženskega (levo) in moškega cvetenja (desno) na napredni ravni verifikatorja Cvetenje.

6.1.3 Obrod

Ta verifikator opisuje prisotnost plodov in njihovo obilnost. Podatke za ta verifikator zbiramo v času obroda dreves *Abies* spp., v srednji Evropi običajno avgusta/septembra.

6.1.3.1 Osnovna raven

Ta verifikator popišemo vsako leto na ravni sestoja. Povprečno stanje ocenimo po pregledu celotne ploskve za monitoring. Zabeležimo dva rezultata, enega za jakost obroda in drugega za delež dreves v sestoji, ki so obrodira.

Šifra	Jakost obroda na ravni sestoja	Povprečni delež krošnje s plodovi (%)
1	Brez obroda: na drevesih ni plodov ali so plodovi le ponekod.	0–10
2	Šibek obrod: na drevesih je nekaj plodov.	> 10–30
3	Zmeren obrod: na drevesih je zmerno število plodov.	> 30–60
4	Močen obrod: na drevesih je veliko plodov.	> 60–90
5	Masiven obrod: na drevesih je ogromno plodov.	> 90

Šifra	Delež dreves v sestoji z navedeno jakostjo obroda (%)
1	0–10
2	> 10–30
3	> 30–60
4	> 60–90
5	> 90

6.1.3.2 Standardna raven

Ta verifikator popišemo v istih letih kot oceno cvetenja na standardni ravni (ne glede na jakost obroda). Popišemo ga na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves. Popis opravimo, preden plodovi začnejo odpadati. Za vsako drevo navedemo en rezultat.

Najbolje je, da po opaženih obilnih cvetenjih zajamemo vsaj en obilen obrod na desetletje. Vendar pa vsakemu obilnemu cvetenju ne sledi nujno obilen obrod. Če ocenjenemu cvetenju ne sledi obilen obrod, moramo oceno cvetenja in obroda ponoviti ob naslednjem obilnem cvetenju, ne glede na to, koliko časa preteče med zaporednima obilnima cvetenjema. Obilen obrod prepoznamo z opazovanjem na osnovni ravni. Obrod je obilen, ko je na osnovni ravni ocenjen kot močen ali masiven (šifra 4 ali 5) in je delež dreves z navedeno stopnjo jakosti obroda večji od 60 % (šifra 4 ali 5).

Šifra	jakost obroda	Delež krošnje s plodovi (%)
1	Brez obroda: na drevesu ni plodov ali so plodovi le ponekod.	0–10
2	Šibek obrod: na drevesu je nekaj plodov.	> 10–30
3	Zmeren obrod: na drevesu je zmerna količina plodov.	> 30–60
4	Močen obrod: na drevesu je veliko plodov.	> 60–90
5	Masiven obrod: na drevesu je ogromno plodov.	> 90

6.1.3.3 Napredna raven

Ta verifikator popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves, v istih letih kot oceno cvetenja na napredni ravni, ne glede na jakost obroda. Popis opravimo, preden plodovi začnejo odpadati. Za vsako drevo navedemo en rezultat in zabeležimo, kateri del krošnje smo opazovali. Obenem naberemo seme za testiranje semena in genetsko analizo za verifikatorje in dodatne informacije na napredni ravni.

Najbolje je, da po opaženih obilnih cvetenjih zajamemo vsaj en obilen obrod na desetletje. Vendar pa vsakemu obilnemu cvetenju ne sledi nujno obilen obrod. Če ocenjenemu cvetenju ne sledi obilen obrod, moramo oceno cvetenja in obroda ponoviti ob naslednjem obilnem cvetenju, ne glede na to, koliko časa preteče med zaporednima obilnima cvetenjema. Obilen obrod prepoznamo z opazovanjem na osnovni ravni. Obrod je obilen, ko je na osnovni ravni ocenjen kot močen ali masiven (šifra 4 ali 5) in je delež dreves z navedeno stopnjo jakosti obroda večji od 60 % (šifra 4 ali 5).

Verifikator popišemo tako, da skozi daljnogled preštujemo storže. Uporabimo povprečni rezultat treh zaporednih štetij. Rezultat vsakega štetja je število storžev, ki jih opazovalec lahko prešteje v 30 sekundah. Pri vseh drevesih moramo preučevati isti del krošnje. Ko izberemo del krošnje, ki ga bomo opazovali, moramo ob vsakem naslednjem spremljanju tega verifikatorja izbrati isti del krošnje. Zgornja tretjina krošnje je za štetje ustrežnejša od spodnjega in srednjega dela.

Zabeležimo dve vrednosti, število plodov in opazovani del krošnje.

Število plodov, prešteti v 30 sekundah (povprečje 3 štetij)

X

Šifra	Opazovani del krošnje
1	Spodnji
2	Srednji
3	Zgornji

6.1.4 Obilnost mladja

Ta verifikator opisuje prisotnost in obilnost mladja na ploskvi za monitoring.

6.1.4.1 Osnovna raven

Ta verifikator popišemo na ravni sestoja, jeseni vsako leto. Za oceno uporabimo strokovno mnenje glede na stanje na celotni ploskvi za monitoring. Zabeležimo dve vrednosti, eno za novo naravno mladje (mladje, ki je vzkalilo v istem letu kot se opravlja opazovanje) in eno za starejše mladje (mladje, ki je starejše od enega leta). Ker drevesa *Abies* spp. obrodijo na tri do pet let, moramo rast novega mladja oceniti naslednje poletje/naslednjo jesen po semenskem letu.

Šifra Opis: novo mladje (mladje starosti do enega leta)

1a Na ploskvi za monitoring ni novega mladja ali ga je zelo malo

2a Na ploskvi za monitoring je zadostna količina novega mladja

Šifra Opis: starejše mladje (mladje starejše od enega leta)

1b Na ploskvi za monitoring ni starejšega mladja ali ga je zelo malo

2b Na ploskvi za monitoring je zadostna količina starejšega mladja

6.1.4.2 Standardna raven

Dormanca semena *Abies* spp. traja eno zimo, zato ta verifikator popisujemo s štetjem rastlin/mladja najprej 1. jesen po obrodu (leto obroda štejemo kot leto 0) in nato 6. jesen po obrodu.

Štetje mladja:

Po vzpostavitvi podploskev za monitoring mladja moramo prešteti vse mladje dreves *Abies* starosti do enega leta na vsaki izmed 20 podploskev. Starejšega jelkega mladja na podploskvah ne štejemo. Pri naslednjem štetju štejemo samo mladje ustrezne starosti – v 6. letu štejemo petletno mladje.

Rezultat štetja mladja na podploskvi

X

Mortaliteto/preživetje mladja izračunamo iz vrednosti, zabeleženih za ta verifikator.

Vzpostavitev podploskev je opisana v razdelku 6.2, Vzpostavitev podploskev za monitoring mladja.

6.1.4.3 Napredna raven

Dormanca semena *Abies* spp. traja eno zimo, zato ta verifikator popišemo tako, da na vsaki od 20 podploskev z mladjem preštejemo mladje 1. jesen po vsakem ocenjenem obrodu (leto obroda štejemo kot leto 0) ter nato 6., 11. in 16. jesen po tem obrodu. Pri vsakem štetju štejemo samo mladje ustrezne starosti: 1. jesen mladje starosti do enega leta, 6. jesen 5-letno mladje, 11. jesen 10-letno mladje itn. Naslednji krog monitoringa obilnosti mladja (vzpostavitev novih 20 podploskev z mladjem in ocenjevanje njegove obilnosti) izvedemo vsaj pet let po prejšnjem ocenjevanem obilnem obrodu (časovni potek ocenjevanja obilnosti mladja prikazuje Preglednica 3). V vsakem obdobju monitoringa se pričakuje ocena obilnosti mladja po enem ali dveh obilnih obrodih.

Preglednica 3: Časovni potek ocenjevanja obilnosti mladja. V spodnjem primeru se prvi obilni obrod zgodi v drugem letu monitoringa, drugi ocenjeni obrod pa pet let pozneje, tj. v sedmem letu monitoringa. Ker se pri *Abies* spp. obilen obrod zgodi na od tri do pet let, se lahko časovni razmik med dvema zaporednima obilnima obrodoma ustrezno razlikuje. Po vsakem ocenjenem obrodu se vzpostavi novih dvajset podploskev z mladjem. Monitoring obilnosti naravnega mladja se za vsako skupino 20 podploskev opravi vsakih pet let. Obrodi, iz katerih je zrastle ocenjevano mladje, in časovni potek ocenjevalnih dejavnosti so obarvani z enako barvo. Po zadnjem štetju mladja se monitoring obilnosti mladja na ustrezni skupini podploskev ustavi in podploskve se ukinejo. S – standardna raven; N – napredna raven.

Leto monitoringa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
Obrod		•					•							•					•					
Ocena mladja za 1. ocenjeni obrod [leta]	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Vzpostavitev podploskev z mladjem			SN																					
Štetje obilnosti mladja			SN					SN					N						N					
Ocena mladja za 2. ocenjeni obrod [leta]								0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Vzpostavitev podploskev z mladjem									SN															
Štetje obilnosti mladja									SN					SN						N				N

Mortaliteto/preživetje mladja izračunamo iz vrednosti, zabeleženih za ta verifikator.

Vzpostavitev podploskev je opisana v razdelku 6.2, Vzpostavitev podploskev za monitoring mladja, štetje pa v razdelku 7.1.4.2, Standardna raven.

6.2 Protokoli za popis dodatnih informacij

6.2.1 Porazdelitev debelinskih razredov

6.2.1.1 Standardna in napredna raven

Prsni premer popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves, vsakih 10 let. Prsni premer je premer debla na višini 1,30 m, tj. približno na višini prsnega koša odraslega človeka. Če ima drevo več kot eno deblo, izmerimo vsa in zabeležimo povprečno vrednost (vendar se skušamo izogniti drevesom s številnimi majhnimi debli). V opombe zapišemo, da je drevo več-debelno. Če je drevo nagnjeno, prsni premer izmerimo pravokotno na drevesno deblo. Prsni premer lahko izmerimo na dva načina:

- 1) s premerko: v tem primeru izmerimo dva premera, pravokotno eden na drugega in izračunamo povprečje;
- 2) z meritvijo obsega drevesa, iz katerega izračunamo premer (delimo ga s številom π , $\sim 3,14$, ali uporabimo pi-meter).

Prsni premer beležimo v cm. Pri vsakem naslednjem merjenju moramo uporabiti isto merilno metodo.

6.2.2 Porazdelitev višinskih razredov

6.2.2.1 Standardna in napredna raven

Višino popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves, vsakih 10 let. Višino izmerimo od tal do najvišjega dela krošnje, najbolje s klinometrom ali višinomerom (npr. Vertex). Višino beležimo v metrih na eno decimalno mesto natančno. Če je krošnja poškodovana, moramo v opombe zapisati tudi to, skupaj z razlogom poškodbe.

6.2.3 Olistanje

Olistanje opisuje razvoj mladih iglic. Pri beli jelki se začne nekoliko pozneje kot cvetenje. Popis te dodatne informacije opravimo samo na standardni in napredni ravni. Podatke za to dodatno informacijo v srednji Evropi zbiramo aprila in maja, do takrat, ko imajo vsa opazovana drevesa polno razvite iglice.

6.2.3.1 Standardna raven

Na standardni ravni olistanje popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves, vsakih pet let. Zanimata nas začetek (2. faza) in konec olistanja (4. faza). Opazovanje se preneha, ko vsa drevesa dosežejo 4. fazo. Običajno je potrebnih šest obiskov. Za vsako drevo zabeležimo dve oceni: faza olistanja in delež krošnje z navedeno fazo olistanja. Faze olistanja prikazuje Slika 5.

Šifra Faza olistanja (poenostavljene faze po [5])

- | | |
|---|--|
| 1 | Brsti so skriti med iglicami in niso vidni, če iglic ne razpremo |
| 2 | Dolžinska rast brstov, vidno odmaknjene brstne luske in membrana |
| 3 | Izrasel je snop mehkih iglic, ki raste v dolžino |
| 4 | Mehki poganjki z razvitimi iglicami |

Šifra

Delež krošnje z navedeno fazo olistanja (%) (prirejeno po [11])

- | | |
|---|---------|
| 1 | > 0–33 |
| 2 | > 33–66 |
| 3 | > 66–99 |
| 4 | 100 |

6.2.3.2 Napredna raven

Na napredni ravni olistanje popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves, vsako leto. Vrednosti (faza olistanja in delež krošnje z navedeno fazo olistanja) so v razdelku 7.2.3.1, Standardna raven.



Slika 5: Slikovni vodnik za opisovanje olistanja (razvoja iglic) na osnovni, standardni in napredni ravni za dodatno informacijo Olistanje.

6.2.4 Usklajenost cvetenja

6.2.4.1 Napredna raven

Usklajenost cvetenja spremljamo samo na napredni ravni na podlagi podatkov, zbranih za verifikator Cvetenje. S to dodatno informacijo ugotavljamo, ali sta moško in žensko cvetenje v opazovanem sestoju časovno usklajeni.

Za vzpostavitev ploskve uporabite obrazec: »GGM – Opis ploskve«

Za popis verifikatorjev uporabite obrazec: «GGM – Terenski verifikatorji«

Za popis dodatnih informacij uporabite obrazec: »GGM – Terenske dodatne informacije«

Viri

1. Alizoti PG, Fady B, Prada MA, Vendramin GG (2011) EUFORGEN Technical guidelines for genetic conservation and use of Mediterranean firs (*Abies* spp). Bioversity International, Rome
2. Aravanopoulos FA, Tollefsrud MM, Graudal L, Koskela J, Kätzel R, Soto A, Nagy L, Pilipovic A, Zhelev P, Božic G and Bozzano M (2015) Development of genetic monitoring methods for genetic conservation units of forest trees in Europe. European Forest Genetic Resources Programme (EUFORGEN), Bioversity International, Rome
3. Carkin RE, Franklin JF, Booth J, Smith CE (1978) Seeding habits of upper-slope tree species: 4. Seed flight of noble fir and Pacific silver fir. Res. Note PNW-312. Corvallis, OR: USDA Forest Service, Pacific Northwest Forest and Range Experiment Station, pp 1-10
4. Caudullo G, Tinner W (2016) *Abies* - Circum-Mediterranean firs in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: San-Miguel-Ayan J, de Rigo D, Caudullo G, Houston Durrant T, Mauri A (ed) European Atlas of Forest Tree Species. Publ. Off. EU, Luxembourg, pp e015be7+
5. Ducci F, De Cuyper B, Paques LE, Proietti R, Wolf H (2012) Reference protocols for assessment of trait and reference genotypes to be used as standards in international research projects. CRA SEL – Arezzo, Italy
6. Eis S (1970) Reproduction and reproductive irregularities of *Abies lasiocarpa* and *A. grandis*. Can J Botany 48:141–143. <https://doi.org/10.1139/b70-018>
7. Farjon A (2010) A Handbook of the World's Conifers. Brill Academic Publishers, Leiden, pp 1-1111. <https://doi.org/10.1163/9789047430629>
8. Fowells HA, Schubert GH (1956) Seed crops of forest trees in the pine region of California. Tech. Bull. 1150. USDA Forest Service, Washington, DC, pp 1-48
9. Franklin JF (1982) Ecology of noble fir. In: Oliver CD, Kenady RM, eds. Proceedings, Symposium on Biology and Management of True Fir in the Pacific Northwest; 1981; Seattle/Tacoma, WA. Contrib. 45. University of Washington - Institute of Natural Resources, Seattle, pp 59–69
10. Franklin JF, Ritchie GA (1970) Phenology of cone and shoot development of noble fir and some associated true firs. Forest Sci 16:356–364
11. FUTMON project (2009 FUT-MON FIELD PROTOCOL PHENOLOGY (D1). <http://www.futmon.org/futmon-field-protocols.html>. Pridobljeno 12 september 2016
12. Houle G (1992) The reproductive ecology of *Abies balsamea*, *Acer saccharum* and *Betula alleghaniensis* in the Tantara Ecological Reserve, Quebec. J Ecol 80:611–623
13. Houle G (1995) Seed dispersal and seedling recruitment: the missing link(s). Ecoscience 2:238–244. <https://doi.org/10.1080/11956860.1995.11682289>
14. Jacobs BF, Werth CR, Guttman, SI (1984) Genetic relationships in *Abies* (fir) of eastern United States: an electrophoretic study. Can J Bot 62(4):609-616
15. Löffler J (1988) Do air pollutants threaten the regeneration potential of West German forests? Allg Forstzts 33:916–918
16. Mauri A, de Rigo D, Caudullo G (2016) *Abies alba* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: San-Miguel-Ayan J, de Rigo D, Caudullo G, Houston Durrant T, Mauri A (ed), European Atlas of Forest Tree Species. Publ. Off. EU, Luxembourg, pp e01493b+. <https://doi.org/10.2788/4251>
17. Nekrasova P (1974) Losses of cone and seed crops in coniferous species. Lesovedenie 4:3–8

18. Owens JN, Molder M (1974) Bud development in western hemlock: 2. Initiation and early development of pollen cones and seed cones. *Can J Bot* 52:283–294. <https://doi.org/10.1139/b74-037>
19. Owens JN, Molder M (1977) Vegetative bud development and cone differentiation in *Abies amabilis*. *Can J Bot* 55:992–1008. <https://doi.org/10.1139/b77-117>
20. Owens JN, Morris SJ (1998) Factors affecting seed production in amabilis fir (*Abies amabilis* (L.) Mill.). *Can J For Res* 28:1146–1163. <https://doi.org/10.1139/x98-089>
21. Pintarić K (1991) Uzgajanje šuma II dio, Tehnika obnove i njege sastojina. Šumarski fakultet u Sarajevu, Sarajevo, pp 1-246
22. Prpić B, Seletković Z (2001) Ekološka konstitucija obične jele. In: Obična jela u Hrvatskoj, Zagreb, pp 255–269
23. Shea PJ (1989a) Interactions among phytophagous insect species colonizing cones of white fir (*Abies concolor*). *Oecologia* 81:104–110. <https://doi.org/10.1007/BF00377018>
24. Shea PJ (1989b) Phytophagous insect complex associated with cones of white fir, *Abies concolor* (Gord. and Glend.) Lindl., and its impact on seed production. *Can Entomol* 121:699–708. doi:10.4039/Ent121699-8
25. Sidhu SS, Staniforth RJ (1986) Effects of atmospheric fluorides on foliage, and cone and seed production in balsam fir, black spruce, and larch. *Can J Bot* 64:923–931. <https://doi.org/10.1139/b86-124>
26. Vidaković M (1982) Četinjače - morfologija i varijabilnost, JAZU i Sveuč. nakl. Liber, Zagreb, pp 1-710
27. Vidaković M (1993) Četinjače - morfologija i varijabilnost. Grafički zavod Hrvatska i Hrvatske šume, p.o. Zagreb, Zagreb, pp 1-741
28. Wolf H (2003) EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for silver fir (*Abies alba* Mill.). International Plant Genetic Resources Institute, Rome
29. Wolfenbarger DO (1946) Dispersion of small organisms: Distance dispersion rates of bacteria, spores, seeds, pollen and insects: incidence rates of diseases and injuries. *Am Midl Nat* 35:1–152

Za veljavno znanstveno nomenklaturu vrst so bili uporabljeni sledeči viri:

- a. CABI (2020) Invasive Species Compendium. CAB International, Wallingford, UK. www.cabi.org/isc. Pridobljeno 15 december 2020
- b. EPPO (2020) EPPO Global Database (available online). <https://gd.eppo.int>. Pridobljeno 15 december 2020
- c. GBIF (2020) Global Biodiversity Information Facility. <https://www.gbif.org> Pridobljeno 15 december 2020
- d. IPNI (2020) International Plant Names Index. The Royal Botanic Gardens, Kew, Harvard University Herbaria & Libraries & Australian National Botanic Gardens. <http://www.ipni.org>, Pridobljeno 10 december 2020
- e. National Center for Biotechnology Information (NCBI) (1998) National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, Bethesda (MD). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Pridobljeno 15 december 2020
- f. The Plant List (2013) Version 1.1. <http://www.theplantlist.org/>. Pridobljeno 12 december 2020
- g. Tropicos.org (2020) Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org>. Pridobljeno 15 december 2020
- h. WFO (2020) World Flora Online. <http://www.worldfloraonline.org>. Pridobljeno 15 december 2020

Smernice za gozdni genetski monitoring

9.2.2 navadne bukve (*Fagus sylvatica* L.)

Marjana WESTERGREN¹, Darius KAVALIAUSKAS², Paraskevi ALIZOTI³,
Marko BAJC¹, Filippos A. ARAVANOPOULOS³, Gregor BOŽIČ¹, Rok DAMJANIČ¹,
Natalija DOVČ¹, Domen FINŽGAR^{1,4}, Barbara FUSSI², Fotios KIOURTSIS⁵,
Hojka KRAIGHER¹

Ilustracije: Marija PRELOG



Navedba: Westergren in sod. (2020) Smernice za gozdni genetski monitoring navadne bukve (*Fagus sylvatica* L.). V: Bajc in sod. (ur.) Priročnik za gozdni genetski monitoring. Gozdarski inštitut Slovenije: Založba Silva Slovenica, Ljubljana, str. 179-194. <http://dx.doi.org/10.20315/SFS.168>

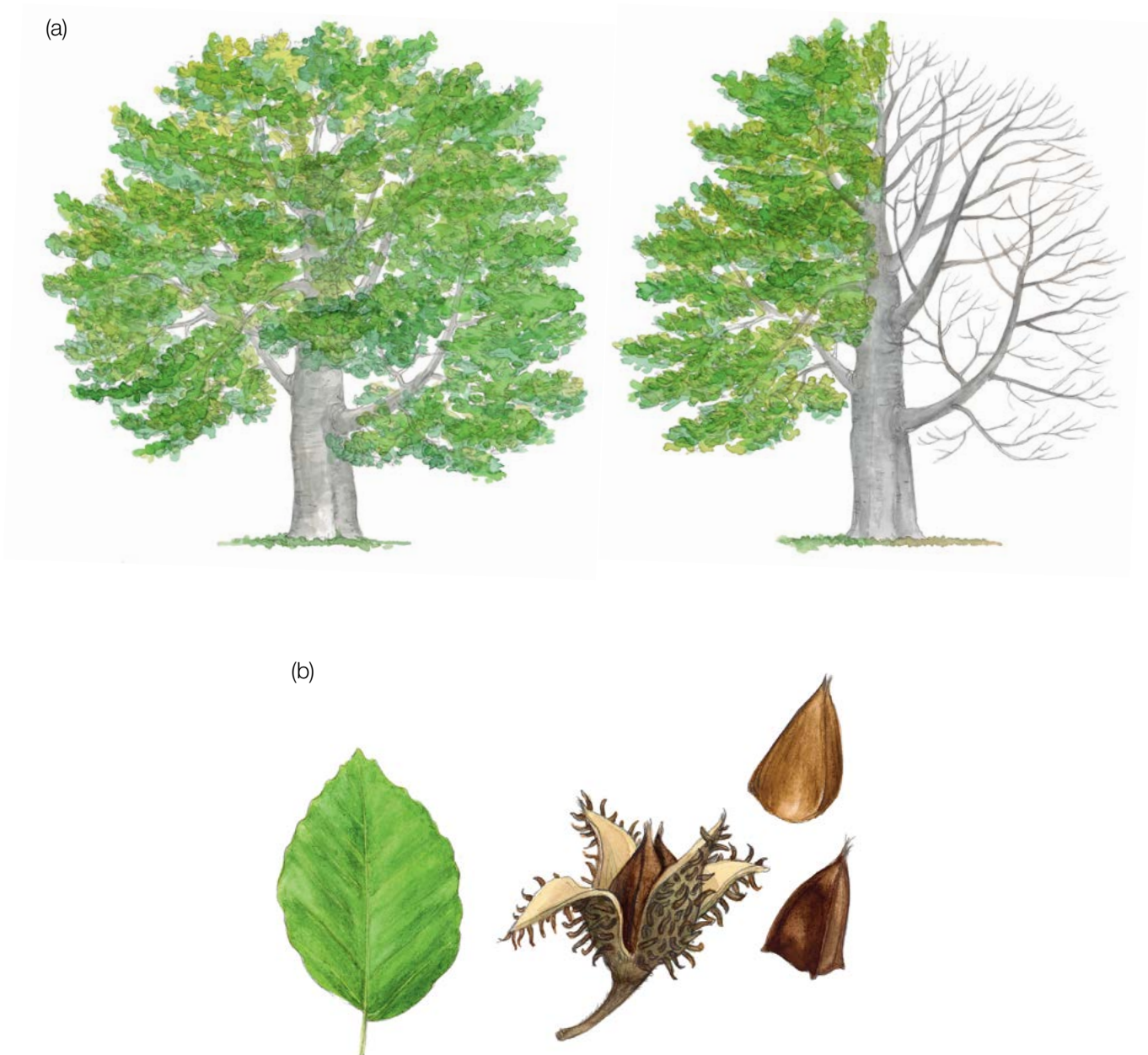
Povezane ustanove:

- ¹ Gozdarski inštitut Slovenije (GIS), Slovenija
- ² Bavarski urad za gozdno genetiko (AWG), Nemčija
- ³ Aristotelova univerza v Solunu (AUTH), Grčija
- ⁴ Inštitut za evolucijsko biologijo, Univerza v Edinburgu, Združeno kraljestvo
- ⁵ Decentralizirana uprava Makedonije in Trakije, Generalni direktorat za gozdarstvo in podeželje, Grčija

1 Povzetek

Navadna bukev (*Fagus sylvatica* L.) je enodomna, sestojna listopadna drevesna vrsta, ki raste v večjem delu Evrope. Je zelo tekmovalna in sencoždržna vrsta, ki se lahko naravno pomlajuje v večini gozdnogojitvenih sistemov in je zmožna ohraniti produktivno sposobnost tal bolje od številnih drugih vrst. Zaradi svojega velikega ekološkega pomena in trdega lesa je dober kandidat za genetski monitoring.

V teh smernicah so na kratko opisani navadna bukev, njeno razmnoževanje, okolje in nevarnosti. Smernice vsebujejo tudi napotke za vzpostavitev ploskve za genetski monitoring in popis vseh terenskih verifikatorjev in dodatnih informacij.



Slika 1: (a) Habitus navadne bukve (*Fagus sylvatica*); (b) list in plod navadne bukve.

2 Opis vrste

Navadna bukev (Slika 1a) je veliko sencozdržno, listopadno drevo, ki v višino zraste od 30 do 40 m, ponekod tudi do 50 m [1]. Ima dolgo življenjsko dobo, saj doseže starost od 250 do 300 let, vendar se za pridobivanje lesa po navadi poseka, ko je drevo staro od 80 do 120 let [1, 2]. V nasprotju s številnimi drugimi drevesnimi vrstami ohranja visoko stopnjo rasti tudi v dobi zrelosti [2]. Lubje je tanko, gladko, srebrno sivo in zelo značilno za bukev [1, 2]. Svetlo zeleni jajčasti listi (Slika 1b) s svilnatimi dlačicami se pozno spomladi spremenijo v bleščeče temno zelene [2]. Imajo šest ali sedem vzporednih žil na obeh straneh glavne žile. Nimajo listnih krp ali konic in imajo kratek pecelj. Pozimi bukev zlahka prepoznamo po ošiljenih dolgih in tankih brstih, ki se ne dotikajo vejic [4].

Na območjih, kjer raste ob vrsti *Fagus orientalis* Lipsky, lahko pride do hibridizacije obeh vrst [1].

3 Razmnoževanje

Bukev je vetrocvetna in enodomna rastlina [1, 2]; moški in ženski cvetovi se ločeno razvijejo na istih vejah, ki rastejo iz istega brsta. Moški cvetovi se razvijejo v obliki majhnih mačic. Razmnoževati se začne zelo pozno, v gozdnih sestojih takrat, ko je drevo staro od 40 do 50 let. Polno semensko leto se po navadi pojavi vsakih 5 do 8 let, včasih tudi v daljših časovnih presledkih, in običajno sledi vročemu poletju prejšnjega leta [1, 3].

Začetek olistanja je različen glede na populacijo in se iz leta v leto spreminja; olistanju, ki se v srednji Evropi pojavi od konca marca do maja, kmalu sledi cvetenje od aprila do maja. Potem ko veter oprashi ženske cvetove, se ti razvijejo v jasno vidne plodove, žir; žir ima tri ostre robove (Slika 1b) in posamezno ali v parih zraste v skledicah z mehкими bodicami [1, 2, 3]. Plodovi dozori in odpadejo z drevesa od septembra do novembra [3]. Bukovo seme ima močno dormanco [3].

Navadna bukev kaže lastnosti klimaksne vrste. Bukkev se učinkovito razširja in naravno pomlajuje ter je zelo tekmovalna, zlasti v senčnih razmerah [1].

4 Okolje

Navadna bukev raste po vsej srednji in zahodni Evropi, na severu njeno območje razširjenosti sega do južne Skandinavije in na jugu do Sicilije [1, 2]. Potrebuje vlažno ozračje s padavinami, ki so dobro razporejene skozi vse leto, zato njeno razširjenost omejujejo visoke poletne temperature, suša in pomanjkanje vlage ter kontinentalnost v severozahodni Evropi [1]. Dobro prenaša zimski mraz, vendar je občutljiva na pozno spomladansko pozebo, ki omejuje njeno razširjenost v severnih borealnih predelih [1]. Dobro uspeva v zmerno rodovitnih, apnenčastih ali rahlo kislih tleh, vendar ne mara tal, v katerih zastaja voda, ali kompaktnih tal [1]. Je sestojna drevesna vrsta [2].

5 Ogroženost

Navadna bukev je odporna vrsta. Toda spomladanske pozebe pogosto poškodujejo mlada drevesa ali cvetove, ki se pojavijo hkrati z listi. Stara drevesa imajo lahko »rdeče srce«, ki zmanjša stabilnost in vrednost lesa. Velika bukova listna hrčica (*Mikiola fagi* Hartig) lahko uniči mlada bukova drevesa in zmanjša prirastek pri močno napadenih drevesih. Bukkev lahko postane tudi gostiteljica karantenske glive *Phytophthora ramorum* Werres, De Cock & Man. Kitajski kozliček (*Anoplophora chinensis* Forster) in azijski kozliček (*Anoplophora glabripennis* Motschulsky), ki izvirata iz Azije, čedalje bolj ogrožata bukev [5].

6 Vzpostavitev in vzdrževanje ploskve

Navadna bukev je sestojna drevesna vrsta, ki lahko tvori čiste ali mešane gozdne sestojne z belo jelko (*Abies alba* Mill.), navadno smreko (*Picea abies* (L.) H. Karst.) in drugimi drevesnimi vrstami [1].

Ploskev za gozdni genetski monitoring sestavlja 50 razmnoževalno aktivnih dreves, ki so drugo od drugega oddaljena najmanj 30 m. Če drevo cveti, ga obravnavamo kot razmnoževalno aktivno. Če ploskev vzpostavljamo zunaj časa cvetenja, lahko za prepoznavanje razmnoževalno aktivnih dreves uporabimo prsni premer in socialni položaj drevesa, pri čemer se opiramo na strokovno znanje revirnega gozdarja. Pri postavljanju ploskve moramo drevesa označiti in zapisati koordinate vseh dreves. Hkrati lahko izmerimo prsni premer in odvezamo vzorce za ekstrakcijo DNK.

Potrebna oprema:

- naprava za merjenje razdalje (priporoča se daljnogled z laserskim daljinomerom),
- kompas,
- barva in čopič ali pršilka za označevanje dreves,
- premerka za merjenje prsnega premera,
- naprava GPS, ki je dovolj natančna in omogoča shranjevanje koordinat dreves.

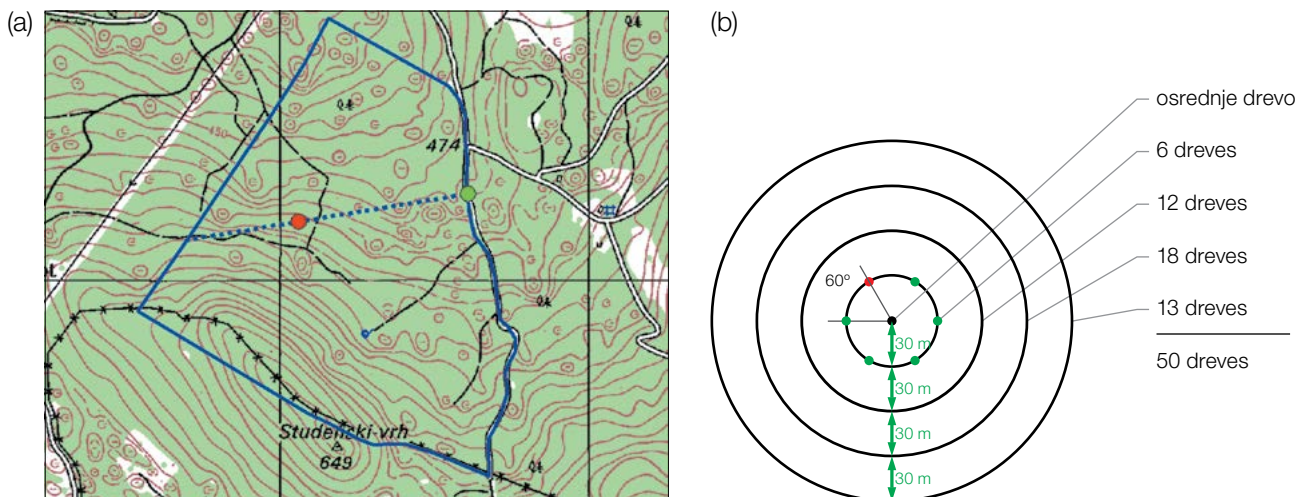
6.1 Vzpostavitev ploskve

6.1.1 Izbira središča ploskve

Splošni postopek za naključno izbiro mesta ploskve obsega korake, navedene v nadaljevanju (Slika 2a):

- naključna izbira točke (zelena pika na Sliki 2a) na zemljevidu ob gozdni cesti ali poti, ki poteka ob sestoju,
- risanje črte, ki je približno pravokotna na cesti, iz naključno izbrane točke na cesti,
- naključna izbira točke na črti (rdeča pika na Sliki 2a) – ta točka je središče ploskve za gozdni genetski monitoring.

Najmanjša razdalja med izbrano središčno točko in mejo sestoja mora biti vsaj 150 metrov. Če izbrana središčna točka ne ustreza tej zahtevi, je treba izbrati novo točko ob upoštevanju protokola, opisanega zgoraj.



Slika 2: Naključna izbira središča ploskve za gozdni genetski monitoring (a); izbira dreves okoli predhodno izbranega osrednjega drevesa v koncentričnih krogih s polmeri, ki se povečujejo za 30 metrov (b).

Namesto postopka, opisanega zgoraj, je mogoče uporabiti tudi orodja za ustvarjanje naključnih točk v programski opremi GIS.

Koordinate izbrane točke je treba shraniti v napravi GPS, ki jo bomo uporabili na terenu.

6.1.2 Vzpostavitev ploskve na terenu

Razmnoževalno aktivno drevo, ki je na terenu najbližje shranjenim koordinatam GPS, postane središče ploskve za monitoring in se označi s številko 1.

Druga drevesa se izberejo okoli osrednjega drevesa v koncentričnih krogih s polmeri, ki se povečujejo za 30 metrov (Slika 2b). Prvo drevo v vsakem od krogov se izbere naključno, to pa se lahko naredi na različne načine: z naključnim azimutom (Preglednica 1), določenim od osrednjega drevesa, s pomočjo smeri sekundnega kazalca na analogni uri ali s katerim koli drugim pristopom, ki omogoča nepristransko izbiro. Preostala drevesa v vsakem od krogov izberemo z ustreznim povečanjem azimuta, da zagotovimo najmanjšo razdaljo 30 metrov med katerima koli drevesoma:

- +60° za prvi krog,
- +30° za drugi krog,
- +20° za tretji krog,
- +15° za četrti krog.

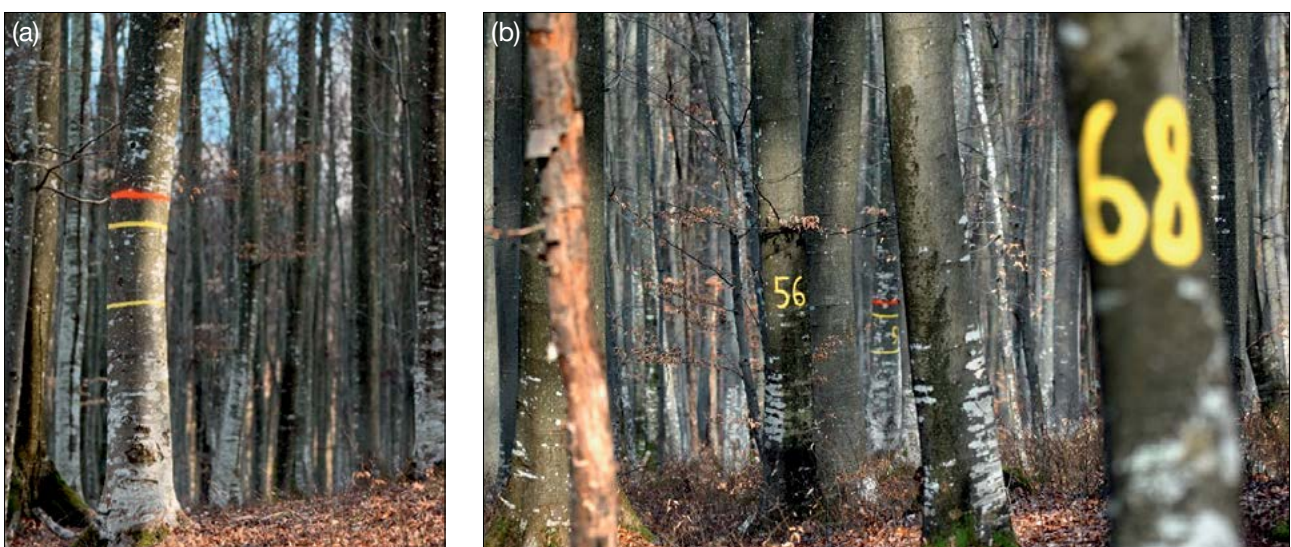
Če v notranjih treh krogih (Slika 2b) ni mogoče najti šestih, dvanajstih in osemnajstih dreves, izberemo dodatna drevesa v zunanem krogu. Zapisati moramo tudi koordinate vsakega drevesa (potrebujemo GPS).

Preglednica 1: Naključno določeni azimuti, ki jih lahko uporabimo za izbiro prvega drevesa v vsakem od krogov.

108	15	186	35	178	29	305	351	44	150
232	23	160	141	112	292	216	83	245	214
63	65	345	234	95	78	279	323	40	236
201	313	275	144	182	68	268	289	185	92
356	177	93	1	145	198	287	251	224	142

6.1.3 Označevanje dreves

Vsako izbrano drevo moramo označiti z ustrežno številko in po možnosti z barvno črto okoli debla za večjo vidnost dreves iz vseh smeri. Osrednje drevo (številka 1) označite z dvema črtama ali več, da se bo razlikovalo od drugih dreves (Slika 3a). Številko je priporočljivo označiti na tisti strani drevesa, ki gleda stran od osrednjega drevesa, saj tako lažje najdemo osrednje drevo, zlasti če stojimo ob zunanjih krogih ploskve (Slika 3b).



Slika 3: a) osrednje drevo na ploskvi za genetski monitoring je označeno z več črtami, da se razlikuje od drugih dreves; b) številke so označene na izbranih drevesih tako, da gledajo stran od osrednjega drevesa.

6.2 Vzpostavitev podploskev za monitoring mladja

Vzpostavitev podploskev z mladjem se opravi v času kalitve po močnem ali masivnem obrodu.

Pomladitvena jedra iz zadnjega semenskega leta na terenu popišemo in zabeležimo njihove lokacije (koordinate GPS, številka drevesa, ki je najbližje pomladitvenemu jedru). Med vsemi popisanimi pomladitvenimi jedri jih naključno izberemo 20 za vzpostavitev podploskev. Če je pomladitvenih jeder 20 ali manj, uporabimo vsa.

Znotraj vsakega pomladitvenega jedra postavimo podploskev za monitoring mladja s površino 1 m², ki jo označimo s kovinskimi palicami. Palice na vsakem oglišču podploskve zapičimo v tla, kolikor je mogoče globoko, da jih ne bi odstranile živali. Vrhove palic za boljšo vidnost pobarvamo.

6.3 Vzdrževanje ploskve

6.3.1 Splošno vzdrževanje

Označbe dreves in podploskev za monitoring mladja redno (vsaki dve leti) pregledujemo in po potrebi popravimo.

6.3.2 Nadomeščanje dreves

Če opazovano drevo odmre ali se v okviru gospodarjenja poseka, ga moramo nadomestiti. Izberemo ustrezno drevo, ki je najbližje odmrlemu in izpolnjuje zahtevo po najmanjši oddaljenosti od najbližjega opazovanega drevesa 30 m. Če to ni mogoče, izberemo drevo z obrobja (najbolje na zunanjem krogu) ploskve za gozdni genetski monitoring. Nadomestno drevo se označi z naslednjo prosto številko, višjo od 50, tj. 51, 52, 53 itd., da ga lahko jasno ločimo od prvotno izbranih 50 dreves.

Če ima drevo poškodovano krošnjo, na primer zaradi vetroloma, ledoloma ali snegoloma, a lahko še obrodi, ga v monitoringu obdržimo. Vzrok poškodbe je treba zabeležiti, saj lahko poškodba vpliva na ugotovljene vrednosti verifikatorjev in dodatnih informacij. Če je škoda prehuda in obrod ni več pričakovan, moramo opazovano drevo nadomestiti.

7 Popis verifikatorjev in dodatnih informacij

Verifikatorje in dodatne informacije na ploskvi za monitoring redno popisujemo. Z verifikatorji spremljamo genetske lastnosti populacije ter njeno prilagajanje okoljskim spremembam in/ali gospodarjenju, dodatne informacije pa popisujemo za lažje tolmačenje verifikatorjev.

Pri popisu verifikatorjev na višjih ravneh (standardna, napredna) moramo popisati tudi podatke za nižje ravni (osnovna, standardna). Pri popisu dodatnih informacij tega ni treba storiti.

7.1 Protokoli za popis verifikatorjev

7.1.1 Mortalitet/preživetje

Mortaliteta opisuje mortaliteto odraslih dreves in naravnega mladja. Nasprotni pojem, preživetje, pomeni drevesa, ki so od zadnje ocene še živa. Oba parametra se izražata v relativnih enotah, tj. deležu odmrlih oziroma preživelih dreves. Preživetje izračunamo s formulo $1 - \text{smrtnost}$.

7.1.1.1 Odrasla drevesa: osnovna, standardna in napredna raven

Verifikator mortaliteta odraslih dreves ocenimo tako, da preštejemo preostala živa označena drevesa vsakih 10 let in po vsakem ekstremnem vremenskem pojavu/motnji. Mortalitet je razlika med začetnim številom označenih dreves in številom še živih dreves izmed prvotnih 50 dreves.

Preglednica 2: Seznam verifikatorjev in dodatnih informacij s kratkim opisom in pogostostjo opazovanja za terensko popisovanje na ploskvah za monitoring bukve.

Ime	Osnovna raven	Standardna raven	Napredna raven	
Verifikatorji	Mortaliteta/ preživetje	Odrasla drevesa: Štetje preostalih označenih dreves vsakih 10 let in po vsakem ekstremnem vremenskem pojavu/motnji	Enaka kot osnovna raven	Enaka kot osnovna raven
		Mladje: /	Štetje preostalega mladja na podploskvah za monitoring mladja, dvakrat na desetletje	Enaka kot standardna raven
	Cvetenje	Ocena na ravni sestoja, vsako leto	Opazovanje na ravni posameznih dreves ob dveh obilnih cvetenjih na desetletje, najbolje v enakomernih časovnih razmikih*	Kot standardna raven, vendar se dodatno popišejo tudi faze razvoja ženskih in moških cvetov*
	Obrod	Ocena na ravni sestoja, vsako leto	Opazovanje na ravni posameznih dreves, v istem letu kot ocena cvetenja na standardni ravni (ne glede na jakost obroda)*	Štetje plodov, v istem letu kot ocena cvetenja na napredni ravni, ne glede na jakost obroda* Za vsak ocenjeni obrod naberemo tudi semena za laboratorijske analize
	Obilnost mladja	Ocena na ravni sestoja, vsako leto	Štetje mladja ustrežne starosti na podploskvah z mladjem v 1. in 6. letu po vsakem ocenjenem obrodu	Štetje mladja ustrežne starosti na podploskvah z mladjem v 1., 6., 11. in 16. letu po vsakem ocenjenem obrodu
Dodatne informacije	Porazdelitev debelinskih razredov	/	Meritev vsakih 10 let	Enaka kot standardna raven
	Porazdelitev višinskih razredov	/	Meritev vsakih 10 let	Enaka kot standardna raven
	Olistanje	/	Opazovanje na ravni posameznih dreves, vsakih 5 let	Opazovanje na ravni posameznih dreves, vsako leto
	Senescenca	/	Opazovanje na ravni posameznih dreves, vsakih 5 let	Opazovanje na ravni posameznih dreves, vsako leto
	Usklajenost cvetenja	/	/	Opazovanje na ravni posameznih dreves, ob vsakem ocenjenem obilnem cvetenju

* Najbolje je, da vsako desetletje ocenimo vsaj en obilen obrod. Vendar pa vsakemu obilnemu cvetenju ne sledi nujno obilen obrod. Če ocenjenemu cvetenju ne sledi obilen obrod, moramo oceno cvetenja in obroda ponoviti ob naslednjem obilnem cvetenju, ne glede na to, koliko časa preteče med zaporednima obilnima cvetenjema. Obilno cvetenje in obrod prepoznamo z opazovanjem na osnovni ravni.

7.1.1.2 Mladje: standardna in napredna raven

Mortaliteto mladja izračunamo iz ocen verifikatorja obilnosti mladja (razdelek 7.1.4). Mortalitet je razlika med začetnim številom mladja in številom še živega mladja ob zadnjem štetju. Za vsako ocenjevanje obilnosti mladje najprej preštejemo v letu kalitve in nato 5 let kasneje na standardni ravni, na napredni ravni pa še 10 in 15 let kasneje. Na standardni ravni za vsako ocenjevanje izračunamo mortaliteto po petih letih, na napredni ravni pa še po 10 in 15 letih. Obilnost mladja se ocenjuje dvakrat na desetletje, najbolje približno vsakih pet let.

7.1.2 Cvetenje

Ta verifikator opisuje jakost cvetenja in delež dreves, ki cvetijo. V srednji Evropi ga je mogoče popisati od aprila do maja.

7.1.2.1 Osnovna raven

Ta verifikator popišemo vsako leto na ravni sestoja. Popis opravimo, ko je cvetenje v polnem zamahu. Povprečno stanje ocenimo po pregledu celotne ploskve za monitoring. Zabeležimo dva rezultata, enega za jakost cvetenja, izraženega kot povprečni delež krošnje s cvetovi, in drugega za delež cvetočih dreves v sestoju.

Šifra	Jakost cvetenja na ravni sestoja	Povprečni delež krošnje s cvetovi (%)
1	Brez cvetenja: na drevesih ni cvetov ali so cvetovi le ponekod.	0–10
2	Šibko cvetenje: na drevesih je nekaj cvetov.	> 10–30
3	Zmerno cvetenje: na drevesih je zmerno število cvetov.	> 30–60
4	Močno cvetenje: na drevesih je veliko število cvetov.	> 60–90
5	Masivno cvetenje: na drevesih je ogromno število cvetov.	> 90

Šifra	Delež dreves v sestoju z navedeno jakostjo cvetenja (%)
1	0–10
2	> 10–30
3	> 30–60
4	> 60–90
5	> 90

7.1.2.2 Standardna raven

Ta verifikator popišemo ob dveh obilnih cvetenjih na desetletje, najbolje v enakomernih časovnih razmikih. Popišemo ga na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves. Cvetenje je obilno, ko je na osnovni ravni ocenjeno kot močno ali masivno (šifra 4 ali 5) in je delež dreves z navedeno stopnjo jakosti cvetenja večji od 60 % (šifra 4 ali 5). Popis opravimo, ko je cvetenje v polnem zamahu. Za vsako drevo navedemo en rezultat.

Šifra	Jakost cvetenja	Delež krošnje s cvetovi (%)
1	Brez cvetenja: na drevesu ni cvetov ali so cvetovi le ponekod.	0–10
2	Šibko cvetenje: na drevesu je nekaj cvetov.	> 10–30
3	Zmerno cvetenje: na drevesu je zmerno število cvetov.	> 30–60
4	Močno cvetenje: na drevesu je veliko število cvetov.	> 60–90
5	Masivno cvetenje: na drevesu je ogromno število cvetov.	> 90

7.1.2.3 Napredna raven

Ta verifikator popišemo ob dveh obilnih cvetenjih na desetletje, najbolje v enakomernih časovnih razmikih. Popišemo ga na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves. Cvetenje je obilno, ko je na osnovni ravni ocenjeno kot močno ali masivno (šifra 4 ali 5) in je delež dreves z navedeno stopnjo jakosti cvetenja večji od 60 % (šifra 4 ali 5). Povprečno sta potrebna dva obiska ploskve; prvi dovolj zgodaj, da opazujemo zgodnje faze cvetenja, in drugi, ko je cvetenje v polnem razmahu.

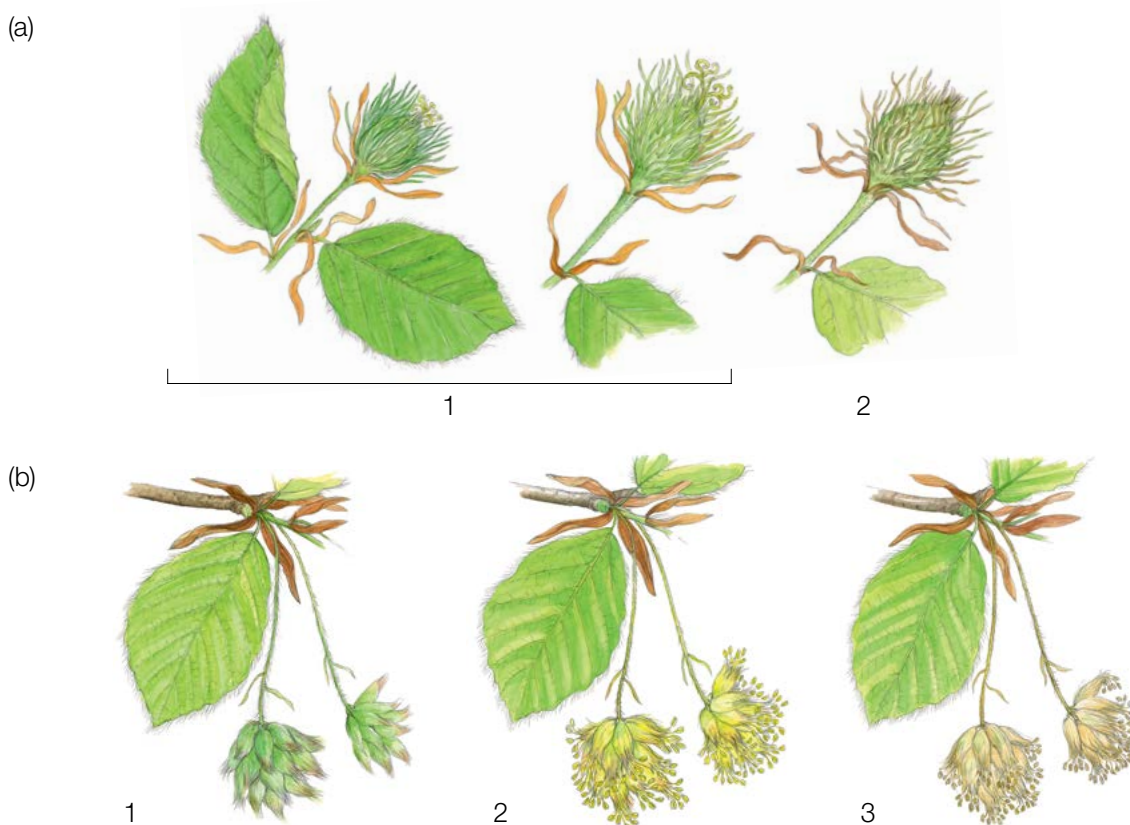
Za vsako drevo navedemo tri rezultate: faza ženskega cvetenja, faza moškega cvetenja in delež krošnje s cvetovi. Delež krošnje s cvetovi se nanaša na skupno število cvetov (moški + ženski) na drevesu. Faze cvetenja prikazuje Slika 4.

Šifra Faza ženskega cvetenja	
1	Ženski cvet polno razvit
2	Plodovi ali oreški so polno razviti, vendar ovoji oreškov še niso odprti

Šifra Faza moškega cvetenja	
1	Podaljšan pecelj – zaprti cvetovi (zeleno)
2	Prašniki sproščajo pelod (rumeno)
3	Prazni prašniki (pelod sproščen) (rjavo)

Šifra	Delež krošnje s cvetovi (%; moški in ženski cvetovi skupaj)
1	0–10
2	> 10–30
3	> 30–60
4	> 60–90
5	> 90

Dodatno informacijo Usklajenost cvetenja lahko ocenimo na podlagi rezultatov za žensko in moško cvetenje, ki ju popiše ta verifikator.



Slika 4: Slikovni vodnik za opisovanje faz ženskega (a) in moškega cvetenja (b) na napredni ravni verifikatorja Cvetenje.

7.1.3 Obrod

Ta verifikator opisuje prisotnost plodov in njihovo obilnost. Podatke za ta verifikator zbiramo v času obroda, v srednji Evropi od avgusta do oktobra.

7.1.3.1 Osnovna raven

Ta verifikator popišemo vsako leto na ravni sestoja. Povprečno stanje ocenimo po pregledu celotne ploskve za monitoring. Zabeležimo dva rezultata, enega za jakost obroda in drugega za delež dreves v sestoji, ki so obrodila.

Šifra	Jakost obroda na ravni sestoja	Povprečni delež krošnje s plodovi (%)
1	Brez obroda: na drevesih ni plodov ali so plodovi le ponekod.	0–10
2	Šibek obrod: na drevesih je nekaj plodov.	> 10–30
3	Zmeren obrod: na drevesih je zmerna količina plodov.	> 30–60
4	Močen obrod: na drevesih je veliko plodov.	> 60–90
5	Masiven obrod: na drevesih je ogromno plodov.	> 90

Šifra	Delež dreves v sestoji z navedeno jakostjo obroda (%)
1	0–10
2	> 10–30
3	> 30–60
4	> 60–90
5	> 90

7.1.3.2 Standardna raven

Ta verifikator popišemo v istih letih kot oceno cvetenja na standardni ravni (ne glede na jakost obroda). Popišemo ga na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves. Popis opravimo, preden plodovi začnejo odpadati. Za vsako drevo navedemo en rezultat.

Najbolje je, da po opaženih obilnih cvetenjih zajamemo vsaj en obilen obrod na desetletje. Vendar pa vsakemu obilnemu cvetenju ne sledi nujno obilen obrod. Če ocenjenemu cvetenju ne sledi obilen obrod, moramo oceno cvetenja in obroda ponoviti ob naslednjem obilnem cvetenju, ne glede na to, koliko časa preteče med zaporednima obilnima cvetenjema. Obilen obrod prepoznamo z opazovanjem na osnovni ravni. Obrod je obilen, ko je na osnovni ravni ocenjen kot močen ali masiven (šifra 4 ali 5) in je delež dreves z navedeno stopnjo jakosti obroda večji od 60 % (šifra 4 ali 5).

Šifra	Jakost obroda	Delež krošnje s plodovi (%)
1	Brez obroda: na drevesu ni plodov ali so plodovi le ponekod.	0–10
2	Šibek obrod: na drevesu je nekaj plodov.	> 10–30
3	Zmeren obrod: na drevesu je zmerna količina plodov.	> 30–60
4	Močen obrod: na drevesu je veliko plodov.	> 60–90
5	Masiven obrod: na drevesu je ogromno plodov.	> 90

7.1.3.3 Napredna raven

Ta verifikator popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves v istih letih kot oceno cvetenja na napredni ravni, ne glede na jakost obroda. Popis opravimo, preden plodovi začnejo odpadati. Za vsako drevo

navedemo en rezultat in zabeležimo kateri del krošnje smo opazovali. Obenem nabereмо seme za testiranje semen in genetsko analizo za verifikatorje in dodatne informacije na napredni ravni.

Najbolje je, da po opaženih obilnih cvetenjih zajamemo vsaj en obilen obrod na desetletje. Vendar pa vsakemu obilnemu cvetenju ne sledi nujno obilen obrod. Če ocenjenemu cvetenju ne sledi obilen obrod, moramo oceno cvetenja in obroda ponoviti ob naslednjem obilnem cvetenju, ne glede na to, koliko časa preteče med zaporednima obilnima cvetenjema. Obilen obrod prepoznamo z opazovanjem na osnovni ravni. Obrod je obilen, ko je na osnovni ravni ocenjen kot močen ali masiven (šifra 4 ali 5) in je delež dreves z navedeno stopnjo jakosti obroda večji od 60 % (šifra 4 ali 5).

Verifikator popišemo tako, da skozi daljnogled preštejemo plodove. Uporabimo povprečni rezultat treh zaporednih štetij. Rezultat vsakega štetja je število plodov, ki jih opazovalec prešteje v 30 sekundah. Pri vseh drevesih moramo preučevati isti del krošnje. Ko izberemo del krošnje, ki ga bomo opazovali, moramo ob vsakem naslednjem spremljanju tega verifikatorja izbrati isti del krošnje. Zgornja tretjina krošnje je za štetje ustrežnejša od spodnjega in srednjega dela.

Zabeležimo dve vrednosti, število plodov in opazovani del krošnje.

Število plodov, prešteti v 30 sekundah (povprečje 3 štetij)

X

Šifra Opazovani del krošnje

1 Spodnji

2 Srednji

3 Zgornji

7.1.4 Obilnost mladja

Ta verifikator opisuje prisotnost in obilnost mladja na ploskvi za monitoring.

7.1.4.1 Osnovna raven

Ta verifikator popišemo na ravni sestoja, jeseni vsako leto. Za oceno uporabimo strokovno mnenje glede na stanje na celotni ploskvi za monitoring. Zabeležimo dve vrednosti, eno za novo mladje (mladje, ki je vzkalilo v istem letu kot se opravlja opazovanje) in eno za starejše mladje (mladje starejše od enega leta).

Šifra Opis: novo mladje (mladje starosti do enega leta)

1a Na ploskvi za monitoring ni novega mladja ali ga je zelo malo

2a Na ploskvi za monitoring je zadostna količina novega mladja

Šifra Opis: starejše mladje (mladje starejše od enega leta)

1b Na ploskvi za monitoring ni starejšega mladja ali ga je zelo malo

2b Na ploskvi za monitoring je zadostna količina starejšega mladja

7.1.4.2 Standardna raven

Ta verifikator popišemo tako, da preštejemo mladje starosti do enega leta 1. jesen po vsakem ocenjenem obrodu (leto obroda štejemo kot leto 0) in 6. jesen po obrodu (takrat štejemo 5 let staro mladje).

Štetje mladja:

Po vzpostavitvi podploskev za monitoring mladja moramo prešteti vse mladje bukve starosti do enega leta na vsaki izmed 20 podploskev. Starejšega bukovega mladja na podploskvah naravnega mladja ne štejemo. Pri naslednjem štetju štejemo samo mladje ustrezne starosti, npr. v 6. letu štejemo petletno mladje.

Rezultat štetja mladja na podploskvi
X

Mortaliteto/preživetje mladja izračunamo iz vrednosti, zabeleženih za ta verifikator.

Vzpostavitev podploskev je opisana v razdelku 6.2, Vzpostavitev podploskev za monitoring mladja.

7.1.4.3 Napredna raven

Ta verifikator popišemo tako, da na vsaki od 20 podploskev z mladjem preštejemo mladje 1. jesen po vsakem ocenjenem obrodu (leto obroda štejemo kot leto 0) ter 6., 11. in 16. jesen po tem obrodu. Pri vsakem štetju štejemo samo mladje ustrezne starosti: 1. jesen mladje starosti do enega leta, 6. jesen 5-letno mladje, 11. jesen 10-letno mladje itn.

Preglednica 3: Časovni potek ocenjevanja obilnosti mladja. V tem primeru se prvi obrod zgodi v 2. letu monitoringa, drugi ocenjeni obrod pa pet let pozneje, tj. v 7. letu monitoringa. Po vsakem ocenjenem obrodu se vzpostavi novih dvajset podploskev za monitoring mladja. Monitoring obilnosti mladja se za vsako skupino 20 podploskev opravi vsakih pet let. Obrodi, iz katerih je zrastle ocenjevano mladje, in časovni potek ocenjevalnih dejavnosti so obarvani z enako barvo. Po zadnjem štetju mladja se monitoring obilnosti mladja na ustrezni skupini podploskev ustavi in podploskve se ukinejo. S – standardna raven; N – napredna raven.

Leto monitoringa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
Obrod		•					•							•					•					
Ocena mladja za 1. ocenjeni obrod [let]	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Vzpostavitev podploskev z mladjem			SN																					
Štetje obilnosti mladja			SN					SN					N						N					
Ocena mladja za 2. ocenjeni obrod [let]							0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
Vzpostavitev podploskev z mladjem								SN																
Štetje obilnosti mladja								SN					SN						N				N	

Mortaliteto/preživetje mladja izračunamo iz vrednosti, zabeleženih za ta verifikator.

Vzpostavitev podploskev je opisana v razdelku 6.2, Vzpostavitev podploskev za monitoring mladja, štetje pa v razdelku 7.1.4.2, Standardna raven.

7.2 Protokoli za popis dodatnih informacij

7.2.1 Porazdelitev debelinskih razredov

7.2.1.1 Standardna in napredna raven

Prsni premer popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves vsakih 10 let. Prsni premer je premer debla na višini 1,30 m, tj. približno v višini prsi odraslega človeka. Če ima drevo več kot eno deblo, izmerimo vsa in zabeležimo povprečno vrednost (vendar se skušamo izogniti drevesom s številnimi majhnimi debli). V opombe zapišemo, da je drevo večdebello, in zabeležimo število izmerjenih debel. Če je drevo nagnjeno, prsni premer izmerimo pravokotno na drevesno deblo. Prsni premer lahko izmerimo na dva načina:

- 1) s premerko: v tem primeru izmerimo dva premera, pravokotno eden na drugega, in izračunamo povprečje;
- 2) z meritvijo obsega drevesa, iz katerega izračunamo premer (delimo ga s številom π , $\sim 3,14$, ali uporabimo pi-meter).

Prsni premer zapisujemo v cm. Pri vsakem naslednjem merjenju moramo uporabiti isto merilno metodo.

7.2.2 Porazdelitev višinskih razredov

7.2.2.1 Standardna in napredna raven

Višino popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves vsakih 10 let. Višino izmerimo od tal do najvišjega dela krošnje, najbolje s klinometrom ali višinomerom (npr. Vertex). Višino beležimo v metrih na eno decimalno mesto natančno. Če je krošnja poškodovana, moramo v opombe zapisati tudi to, skupaj z razlogom poškodbe.

7.2.3 Olistanje

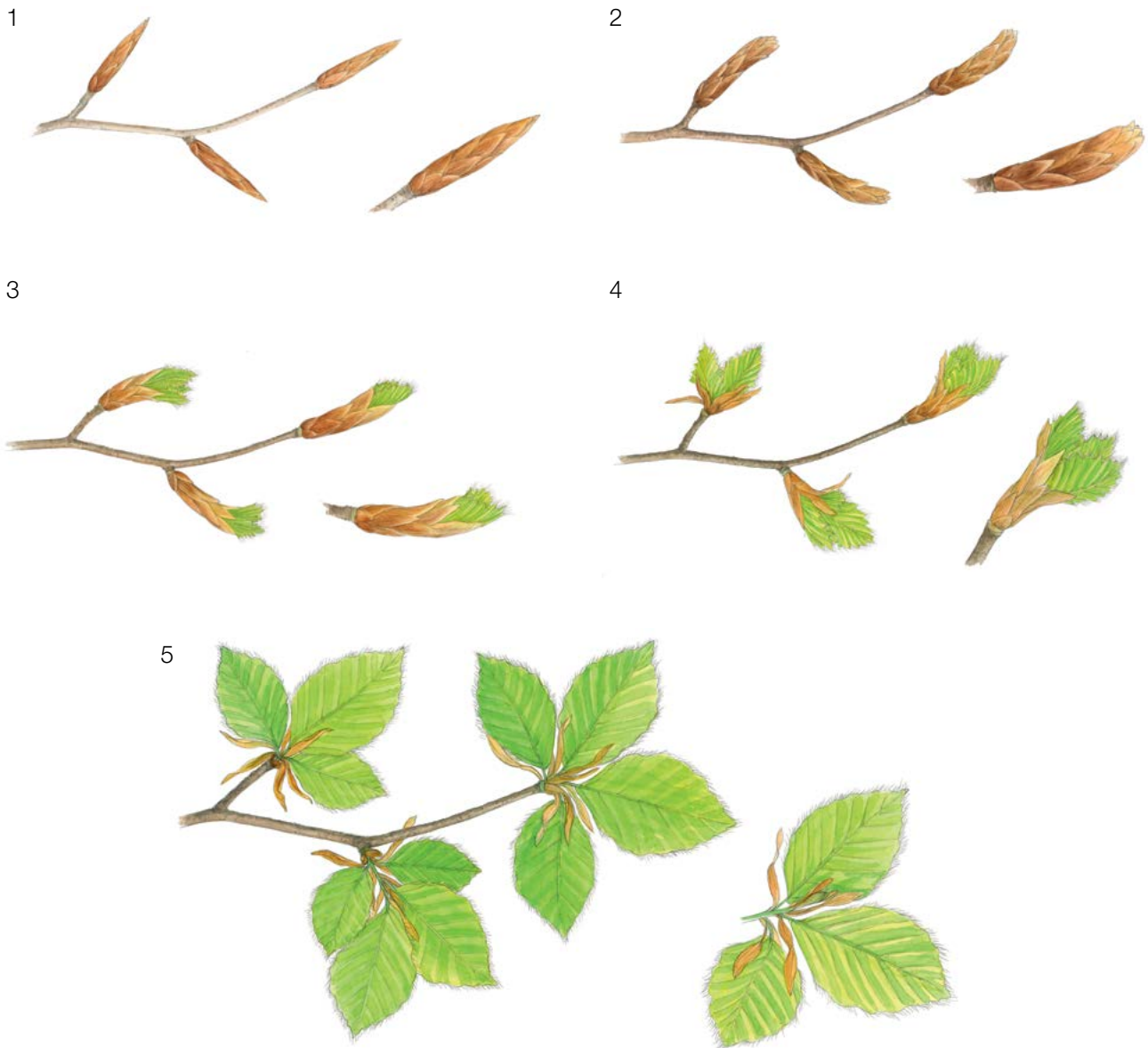
Opisuje proces razvoja listov. Popis te dodatne informacije opravimo samo na standardni in napredni ravni. Podatke za olistanje zbiramo od konca marca (v srednji Evropi) do takrat, ko imajo vsa opazovana drevesa polno razvite liste.

7.2.3.1 Standardna raven

Na standardni ravni olistanje popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves vsakih pet let. Zanimata nas začetek (3. faza) in konec olistanja (5. faza). Opazovanje se preneha, ko vsa drevesa dosežejo 5. fazo. Običajno je potrebnih šest obiskov. Za vsako drevo zabeležimo dve oceni: faza olistanja in delež krošnje z navedeno fazo olistanja. Faze olistanja prikazuje Slika 5.

Šifra	Faza olistanja
1	Speči zimski brst
2	Brsti so napeti in podaljšani
3	Brsti se začenjajo odpirati (viden je prvi zeleni del)
4	Pojavljati se začenjajo zaprti listi z dlačicami; vidni so posamezni zaprti listi z dlačicami
5	Listi so popolnoma razprti, gladki in svetli

Šifra	Delež krošnje z navedeno fazo olistanja (%)
1	> 0–33
2	> 33–66
3	> 66–99
4	100



Slika 5: Slikovni vodnik za opisovanje olistanja na standardni in napredni ravni za dodatno informacijo Olistanje.

7.2.3.2 Napredna raven

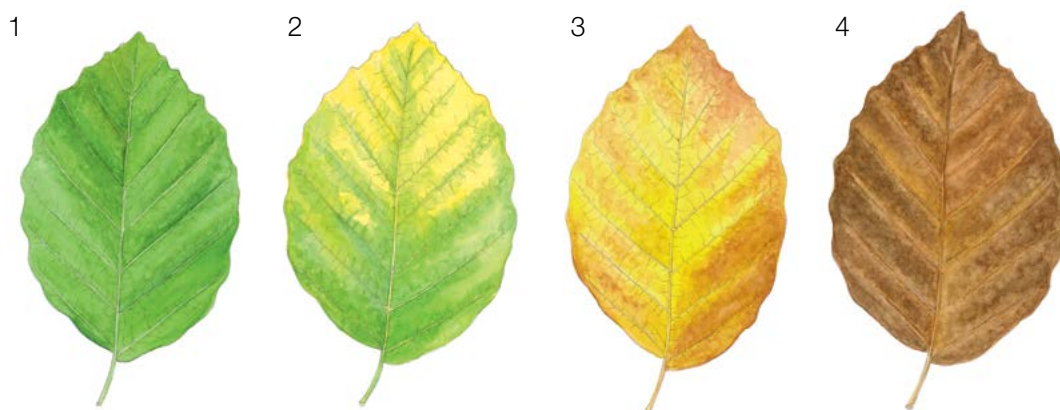
Na napredni ravni olistanje popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves vsako leto na enak način kot na standardni ravni. Več podrobnosti je v razdelku 7.2.3.1, Standardna raven.

7.2.4 Senescenca

Senescenca opisuje proces senescence listov. Popis te dodatne informacije opravimo samo na standardni in napredni ravni.

7.2.4.1 Standardna raven

Na standardni ravni senescenco popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves vsakih pet let. Zanima nas 3. faza, ko so listi rumeni in v njih več ne poteka fotosinteza. Opazovanje se preneha, ko vsa



Slika 6: Slikovni vodnik za opisovanje senescence na standardni in napredni ravni za dodatno informacijo senescenca.

drevesa dosežejo 3. fazo. Običajno sta potrebna dva obiska ploskve. Za vsako drevo zabeležimo dve oceni: faza senescence in delež krošnje z navedeno fazo senescence. Faze senescence prikazuje Slika 6.

Šifra	Faza senescence
1	Listi so zeleni
2	Listi so zelene barve, ki se spreminja v rumeno (zelenkasto rumena)
3	Listi so rumene barve, ki se spreminja v rjavo (rjavkasta)
4	Listi so rjavi/odpadli

Šifra	Delež krošnje z navedeno fazo senescence (%)
1	> 0–33
2	> 33–66
3	> 66–99
4	100

7.2.4.2 Napredna raven

Senescenco popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves vsako leto na enak način kot na standardni ravni. Več podrobnosti je v razdelku 7.2.4.1, Standardna raven.

7.2.5 Usklajenost cvetenja

7.2.5.1 Napredna raven

Usklajenost cvetenja spremljamo samo na napredni ravni na podlagi podatkov, zbranih za verifikator Cvetenje. S to dodatno informacijo ugotavljamo, ali sta moško in žensko cvetenje v spremljanem sestoji časovno usklajena.

Za vzpostavitev ploskve uporabite obrazec »GGM - Opis ploskve«

Za popis verifikatorjev uporabite obrazec: »GGM - Terenski verifikatorji«

Za popis dodatnih informacij uporabite obrazec: »GGM - Terenske dodatne informacije«

8 Viri

1. Houston Durrant T, de Rigo D, Caudullo G (2016) *Fagus sylvatica* and other beeches in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: San-Miguel-Ayanz J, de Rigo D, Caudullo G, Houston Durrant T, Mauri A (Eds.) European Atlas of Forest Tree Species. Publ. Off. EU, Luxembourg, pp 94-97. DOI: 10.2788/4251
2. von Wuehlich G (2008) EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for European beech (*Fagus sylvatica*). Bioversity International, Rome
3. Kraigher H, Westergren M (2011) Gozdno semenarstvo in drevesničarstvo. In: Gospodarjenje z gozdom za lastnike gozdov. Kmečki glas, Ljubljana
4. Johnson O & More D (2010) Collins Tree guide. Slovenian edition, Narava d.o.o., Kranj
5. Ogris N (2020) Varstvo gozdov Slovenije – portal. https://www.zdravgozd.si/meni_index.aspx. Pridobljeno 15 september 2020
6. Bajc M, Aravanopoulos FA, Westergren M, Fussi B, Kavaliauskas D, Alizoti P, Kiourtsis F, Kraigher H (ur.) (2020) Priročnik za gozdni genetski monitoring. Gozdarski inštitut Slovenije: Založba Silva Slovenica, Ljubljana. <http://dx.doi.org/10.20315/SFS.167>

Za veljavno znanstveno nomenklaturu vrst so bili uporabljeni sledeči viri:

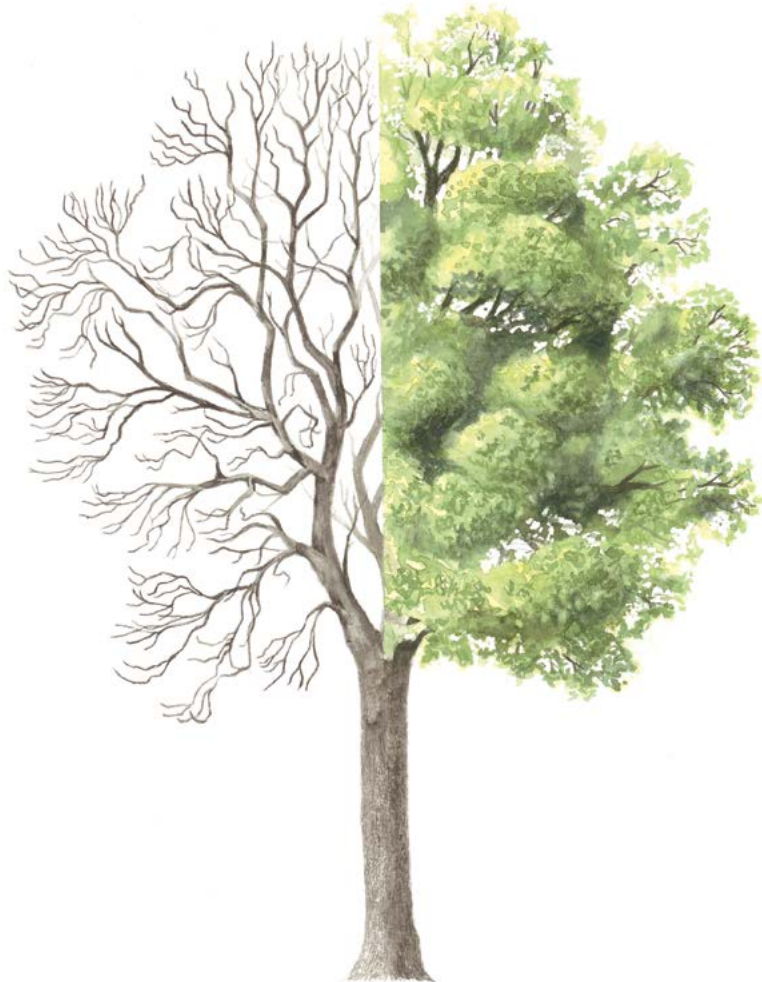
- a. CABI (2020) Invasive Species Compendium. CAB International, Wallingford, UK. www.cabi.org/isc. Pridobljeno 15 december 2020
- b. EPPO (2020) EPPO Global Database (available online). <https://gd.eppo.int>. Pridobljeno 15 december 2020
- c. GBIF (2020) Global Biodiversity Information Facility. <https://www.gbif.org> Pridobljeno 15 december 2020
- d. IPNI (2020) International Plant Names Index. The Royal Botanic Gardens, Kew, Harvard University Herbaria & Libraries & Australian National Botanic Gardens. <http://www.ipni.org>, Pridobljeno 10 december 2020
- e. National Center for Biotechnology Information (NCBI) (1998) National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, Bethesda (MD). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Pridobljeno 15 december 2020
- f. Stevens PF (2001) Angiosperm Phylogeny Website, Version 14. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Pridobljeno 15 december 2020
- g. The Plant List (2013) Version 1.1. <http://www.theplantlist.org/>. Pridobljeno 12 december 2020
- h. Tropicos.org (2020) Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org>. Pridobljeno 15 december 2020
- i. WFO (2020) World Flora Online. <http://www.worldfloraonline.org>. Pridobljeno 15 december 2020

Smernice za gozdni genetski monitoring

9.2.3 velikega jesena (*Fraxinus excelsior* L.)

Marjana WESTERGREN¹, Marko BAJC¹, Rok DAMJANIĆ¹, Barbara FUSSI²,
Dalibor BALLIAN^{1,3}, Andrej BREZNIKAR⁴, Darius KAVALIAUSKAS²,
Peter ŽELEZNIK¹, Hojka KRAIGHER¹

Ilustracije: Metka KLADNIK



Navedba: Westergren in sod. (2020) Smernice za gozdni genetski monitoring velikega jesena (*Fraxinus excelsior* L.). V: Bajc in sod. (ur.) Priročnik za gozdni genetski monitoring. Gozdarski inštitut Slovenije: Založba Silva Slovenica, Ljubljana, str. 195-213. <http://dx.doi.org/10.20315/SFS.168>

Povezane ustanove:

- ¹. Gozdarski inštitut Slovenije (GIS), Slovenija
- ². Bavarski urad za gozdno genetiko (AWG), Nemčija
- ³. Univerza v Sarajevu, Fakulteta za gozdarstvo, Bosna in Hercegovina
- ⁴. Zavod za gozdove Slovenije (ZGS), Slovenija

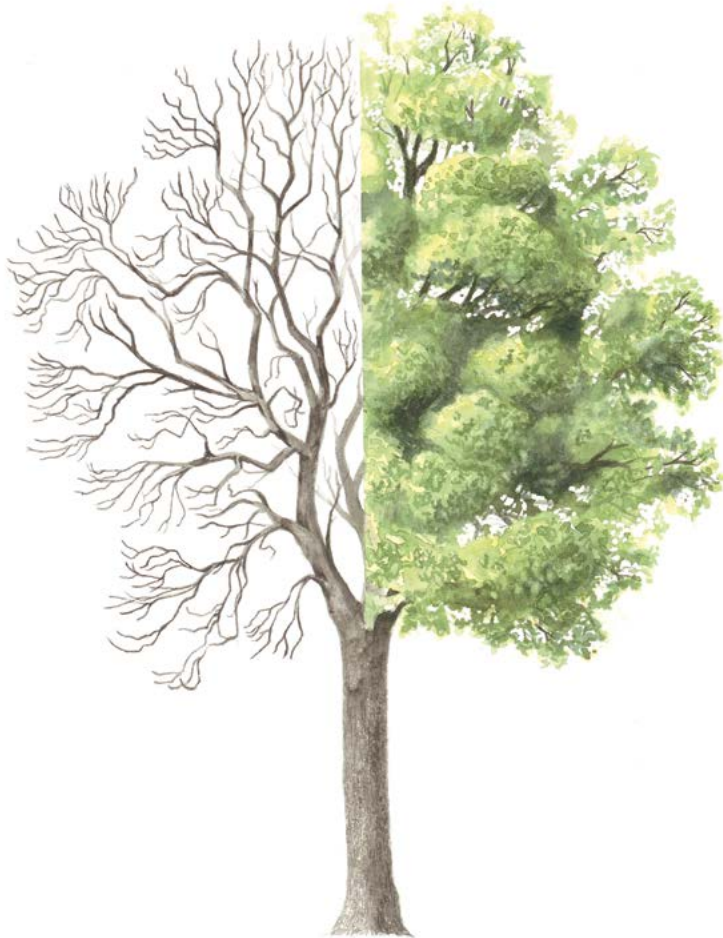
1 Povzetek

Veliki jesen (*Fraxinus excelsior* L.) je poligamna listopadna drevesna vrsta, razširjena po vsej Evropi razen v najbolj suhih sredozemskih predelih. Veliki jesen lahko tvori čiste sestoje, vendar se pogosteje pojavlja kot manjšinska vrsta v manjših skupinah dreves v mešanih sestojih. V tesnem sorodu je s poljskim jesenom (*F. angustifolia* Vahl.), s katerim se tudi križa. Zaradi velikega ekološkega pomena in uporabnosti v lesni industriji je ta vrsta, ki jo močno ogroža jesenov ožig, prvovrsten kandidat za genetski monitoring.

V teh smernicah so na kratko opisani veliki jesen, njegovo razmnoževanje, okolje in nevarnosti. Smernice vsebujejo tudi napotke za vzpostavitev ploskve za genetski monitoring in popis vseh terenskih verifikatorjev in dodatnih informacij.

2 Opis vrste

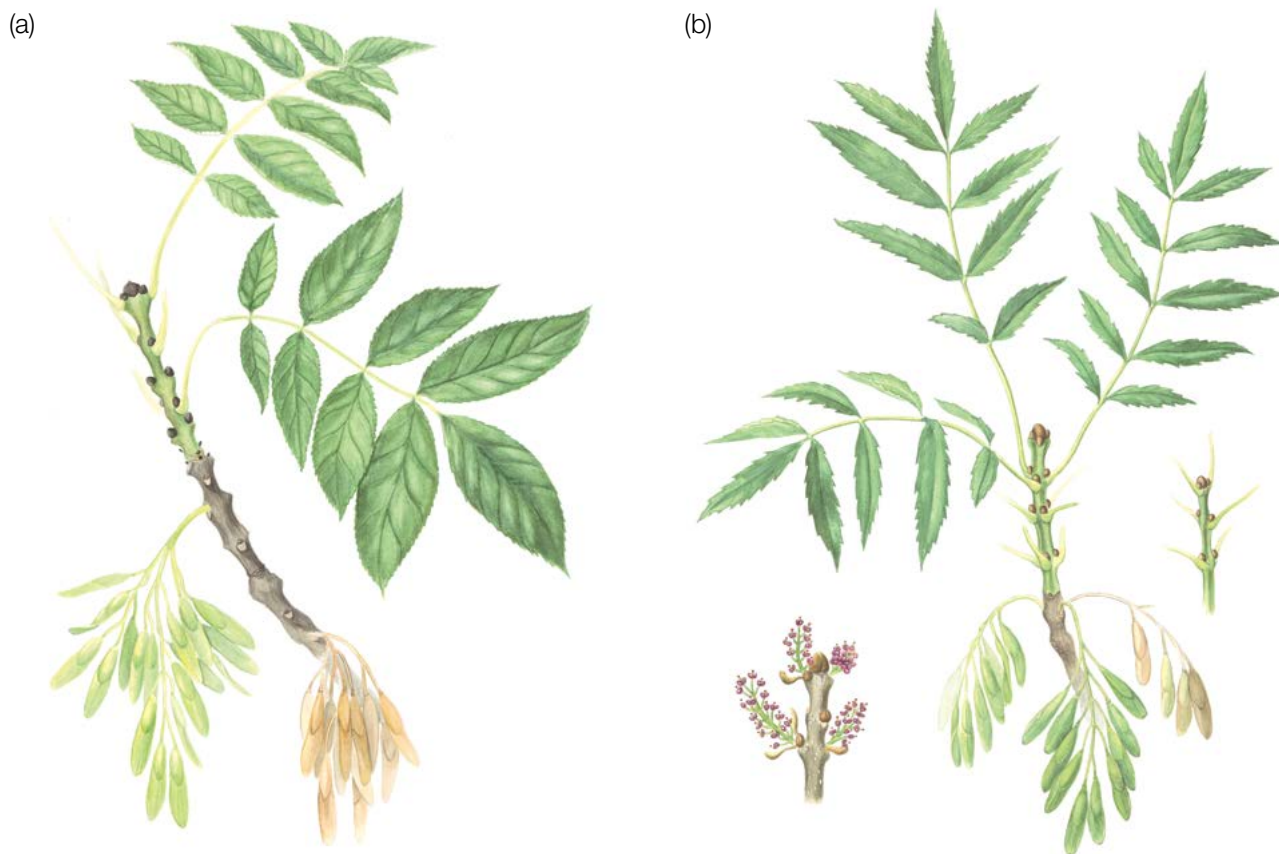
Veliki jesen (Slika 1) je listopadno drevo, ki je lahko v starosti od 90 do 120 let visoko do 40 m [1]. Krošnja je nepravilna z močnimi vejami, v gozdnih sestojih je podaljšana [1]. Skorja je blede rjava do siva in s staranjem postane razpokana [2]. Pozimi drevo zlahka prepoznamo po gladkih vejicah z opaznimi črnimi žametastimi brsti na nasprotnih straneh. Listi so pernato sestavljeni, običajno iz 7 do 13 jajčastih lističev z dolgimi konicami, vključno z enim dodatnim »terminalnim« lističem na koncu [2, 3] (Slika 2a). Listi so dolgi do 35 cm [2], svetlo zeleni na spodnji in zeleno sivi na zgornji strani.



Slika 1: Habitus velikega jesena (*F. excelsior*).

Veliki jesen je v tesnem sorodu z vrsto *F. angustifolia*. Najzanesljivejša lastnost, po kateri ju lahko razlikujemo, je oblika socvetja; pri velikem jesenu je socvetje razvejano, medtem ko ima pri *F. angustifolia* obliko preprostega nerazvejanega grozda [3]. Vendar pa imajo nekatera drevesa *F. excelsior* mešana socvetja z dvospolnimi

cvetovi samo na glavni osi in moškimi cvetovi samo na sekundarnih vejah socvetij, zato lahko pride do napačne razpoznave, saj je po odpadu moških cvetov nastali grozd lahko videti kot nerazvejani grozd *F. angustifolia* [3]. Na območjih, kjer vrsti raste skupaj, so bili opaženi križanci [2, 3].



Slika 2: Morfološki znaki za razlikovanje med *F. excelsior* (a) in *F. angustifolia* (b).

3 Razmnoževanje

Veliki jesen je poligamen. Lahko razvije samo moška ali samo ženska socvetja na enem drevesu, enospolna socvetja s samo moškimi in ženskimi socvetji, ki rastejo na istem drevesu, ali celo dvospolna socvetja [1, 2, 3]. Zmožen je samooprašitve [3]. Vendar pa semena, nastala po samooprašitvi, težje preživijo zaradi izroda, zato je vrsta morda funkcionalno dvodomna [3]. Moška in ženska socvetja so vijoličasta in se v srednji Evropi pojavijo med marcem in aprilom, pred spomladanskim olistanjem, v suličastih šopih na koncih vejic. Mladi listi se razvijejo po koncu cvetenja, iz poganjkov, ki zrastejo iz terminalnih brstov. Začetek olistanja je različen glede na populacijo in se iz leta v leto spreminja; cvetenje in olistanje sta zgodnejša, če je bila zima mila [3].

Ko veter oprashi ženska socvetja, se pozno poleti in jeseni razvijejo v jasno vidne krilate plodove – krilate oreške. Z dreves padajo pozimi in zgodaj spomladi, večinoma jih raznese veter [1, 2, 3]. Posamična drevesa začnejo cveteti pri 15 do 20 letih, drevesa v sestoji pri starosti okrog 30 let. Cvetijo v neenakomernih presledkih [1]. Dormanca semena pred kalitvijo navadno traja dve zimi, lahko tudi dlje, na suhih ali visokih rastiščih do šest let [2, 3].

Veliki jesen kaže lastnosti, ki ga uvrščajo na vmesno področje med pionirsko in klimaksno vrsto. Čeprav se učinkovito razširja in naravno pomlajuje, je tekmovalna sposobnost vrste velika le, kadar so izpolnjene njene ekološke potrebe [2, 3]. Vegetativna obnova po sečnji na panj je dobra [3].

3.1 Prepoznavanje spola drevesa

Moška drevesa so tista, na katerih je večina socvetij moških. To kategorijo lahko nadalje delimo na popolnoma moška drevesa (s samo moškimi socvetji) in drevesa z mešanimi moškimi in dvospolnimi socvetji. Ta mešana moško-dvospolna drevesa lahko tvorijo nekaj semen [3].

Ženska drevesa so tista z večinoma ženskimi socvetji in tvorijo semena [3].

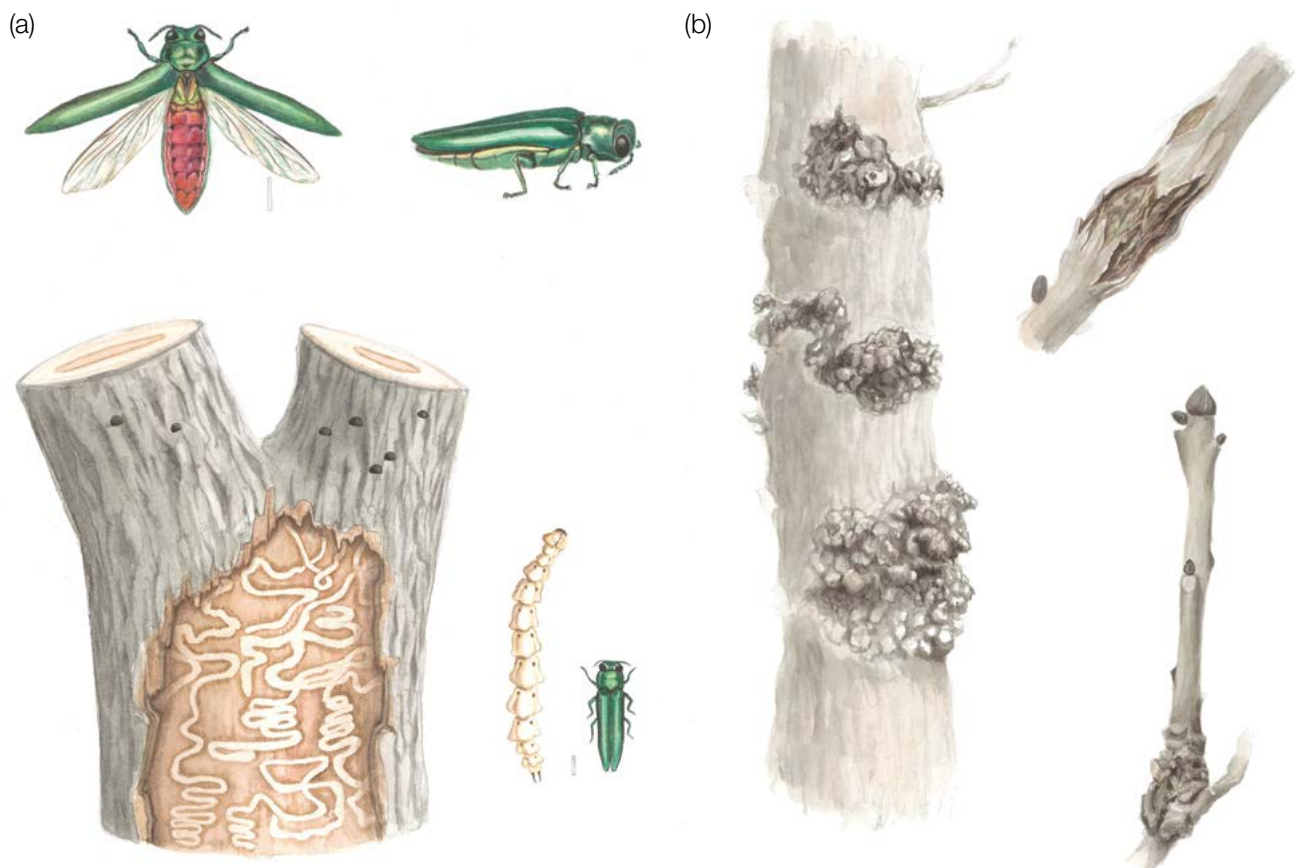
Dvospolna drevesa so tista z večinoma dvospolnimi socvetji. Večinoma tvorijo semena, lahko pa nekaj semen tudi zaplodijo, saj proizvajajo pelod. Dvospolna drevesa lahko spreminjajo spol in v semenskih letih postajajo bolj ženska ali bolj moška [3].

4 Okolje

Veliki jesen je razširjen po vsej Evropi, ne raste le v najbolj suhih sredozemskih predelih, saj ne prenaša daljših poletnih suš, in v severnih borealnih predelih, kjer mladju preti poznospomladanska pozeba [1, 2, 3]. Najbolje uspeva v bogatih tleh s pH nad 5,5, njegova lokalna porazdelitev je odvisna od tal. Jesen dobro prenaša sezonsko zastajanje vode, daljših poplav pa ne prenese [2]. Večinoma je manjšinska drevesna vrsta in redko tvori čiste sestoje; pogosteje se pojavlja v majhnih skupinah v mešanih sestojih [2].

5 Ogroženost

Veliki jesen trenutno najbolj ogroža gliva *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya (prej *Chalara fraxinea*). Bolezen, ki so jo leta 1992 odkrili na Poljskem, je danes razširjena po vsej Evropi in v številnih državah je prizadetih do 80 ali 90 % dreves. Med simptomi so hudo odpadanje listov, venenje, nekroze debelne



Slika 3: Jesenov krasnik, nova nevarnost velikemu jesenu (a), in jesenov rak (b).

skorje in razbarvanost lesa. Prizadeti so jeseni vseh velikosti in starosti (odrasla drevesa in mladje). Bolezen se po opažanjih širi s hitrostjo do 20 ali 30 km na leto. Širi se s sporami, pa tudi prek rastlinskega materiala. Jesen ogrožajo še povzročitelji jesenovega raka *Neonectria ditissima* (Tul. & C. Tul.) Samuels & Rossman in *Pseudomonas savastanoi* (Janse) Gardan, et al., *Phyllactinia fraxini* (DC.) Fuss, *Armillaria gallica* Marxm. & Romagn. idr. [2, 4] (Slika 3b).

Uničujoče posledice bi lahko imel jesenov krasnik (*Agrilus planipennis* Fairmaire), hrošč, ki izvira iz Azije in vzhodne Rusije (Slika 3a). Odrasle žuželke jedo jesenove liste, ličinke pa se prehranjujejo s floemom in s tem ubijejo drevo. Krasnika so leta 2007 opazili v zahodni Rusiji in na Švedskem, kar je zelo zaskrbljujoče, saj bi se lahko razširil po vsej Evropi in do konca uničil še preostali jesen, kot se je zgodilo v ZDA [2, 4].

6 Vzpostavitev in vzdrževanje ploskve

Ploskev za gozdni genetski monitoring sestavlja 50 razmnoževalno aktivnih dreves, ki so drugo od drugega oddaljena najmanj 30 m. Če drevo cveti, ga obravnavamo kot razmnoževalno aktivno. Če ploskev vzpostavljamo zunaj časa cvetenja, lahko za prepoznavanje razmnoževalno aktivnih dreves uporabimo prsni premer in socialni položaj drevesa, pri čemer se opiramo na strokovno znanje revirnega gozdarja. Pri postavljanju ploskve moramo drevesa označiti in zabeležiti koordinate vseh dreves. Hkrati lahko izmerimo prsni premer in odvzamemo vzorce za ekstrakcijo DNK.

Ker je veliki jesen večinoma manjšinska* drevesna vrsta, je potrebna predhodna preučitev terena; velikost in oblika ploskve za genetski monitoring morata biti prilagojeni tako, da ploskev vsebuje 50 razmnoževalno aktivnih dreves. Petindvajset dreves mora biti funkcionalno ženskih, petindvajset pa funkcionalno moških. Dvospolna drevesa so pogosto funkcionalno ženska, saj tvorijo veliko semen. Ker lahko dvospolna drevesa spreminjajo spol in v semenskih letih postajajo bolj ženska ali bolj moška, se lahko dejanski delež funkcionalno ženskih oziroma moških dreves z leti spreminja.

- Veliki jesen se v večjem delu naravnega območja razširjenosti, tudi Sloveniji, pojavlja kot manjšinska drevesna vrsta. Na lokacijah kjer tvori sestoje, pa je ploskev za genetski monitoring potrebno vzpostaviti v skladu s smernicami za sestojne vrste, npr. navadno bukev (*Fagus sylvatica* L.).

Potrebna oprema:

- naprava za merjenje razdalje (priporoča se daljnogled z laserskim daljinomerom),
- kompas,
- barva in čopič ali pršilka za označevanje dreves,
- premerka za merjenje prsnega premera,
- naprava GPS, ki je dovolj natančna in omogoča shranjevanje koordinat dreves.

6.1 Vzpostavitev ploskve

6.1.1 Izbira ploskve

Najustreznejši čas za začetna dela pri vzpostavljanju ploskve za monitoring *F. excelsior* je spomladi, ko drevesa cvetijo. V tem času vsa drevesa v sestoji kartiramo z napravo GPS in popišemo njihov spol. Poleti, ko drevesa obrodijo, popišemo funkcionalni spol dvospolnih dreves.

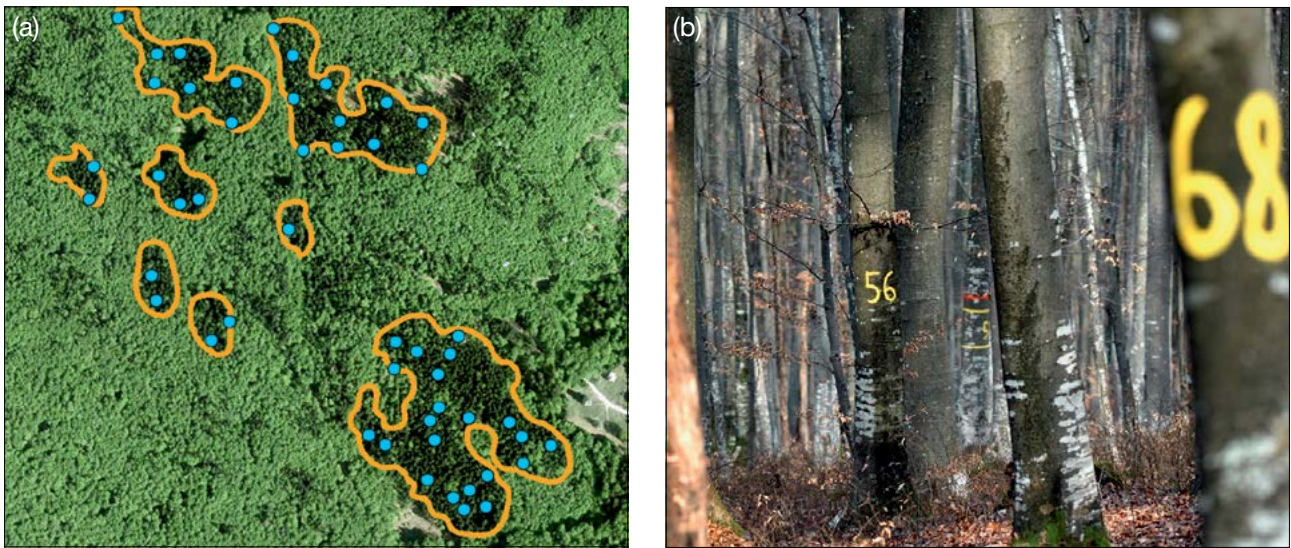
Ko smo popisali spol (in funkcionalni spol dvospolnih dreves), GPS-lokacije vseh dreves vnesemo na karto v programu GIS kot sloj točkovnih objektov. Naključno izberemo petdeset točk, ki predstavljajo drevesa, pri čemer morajo biti točke med seboj oddaljene najmanj 30 m, z razmerjem 50 % funkcionalno moških in 50 % funkcionalno ženskih dreves, vključno z moškimi, ženskimi in dvospolnimi drevesi. Da bi se izognili napakam pri

meritvah GPS, priporočamo, da je razdalja med drevesi vsaj 35 m (prilagoditev najmanjše razdalje na 35 m). Pri postavljanju ploskve moramo ta vnaprej izbrana drevesa na terenu identificirati in označiti (Slika 4a).

Če za ugotavljanje spola dreves nista mogoča dva obiska terena, moramo ploskev vzpostaviti poleti: popišemo spol dreves in nato naključno izberemo 25 funkcionalno moških (drevesa brez obroda) in 25 funkcionalno ženskih (drevesa, ki so obrodila).

6.1.2 Postavitev ploskve na terenu

Drevesa, ki smo jih v pisarni naključno izbrali, s pomočjo GPS v gozdnem sestoju poiščemo in označimo. Še enkrat preverimo, ali je razdalja med drevesi najmanj 30 m.



Slika 4: Na karti prikazane lokacije naključno izbranih dreves, ki rastejo v več manjših skupinah (a); vsako izbrano drevo na ploskvi za genetski monitoring je potrebno označiti z ustrežno številko (slika prikazuje ploskev za genetski monitoring navadne bukve (*Fagus sylvatica* L.) v Sloveniji). Za izboljšanje vidnosti izbranih dreves iz vseh smeri se priporoča, da se poleg številke nariše tudi črta okoli celotnega obsega debla.

6.1.3 Označevanje dreves

Vsako izbrano drevo moramo označiti z ustrežno številko (od 1 do 50) in po možnosti z barvno črto okoli debla za večjo vidnost iz vseh smeri (Slika 4b).

6.2 Vzpostavitev podploskev za monitoring mladja

Vzpostavitev podploskev z mladjem se opravi v času kalitve dve ali več let po močnem ali masivnem obrodu; časovni zamik je odvisen od trajanja dormance semena v posamezni populaciji.

Naravna pomladitvena jedra iz zadnjega semenskega leta na terenu popišemo in zabeležimo njihove lokacije (koordinate GPS, številka drevesa, ki je nablížje pomladitvenemu jedru). Med vsemi popisanimi pomladitvenimi jedri jih naključno izberemo 20 za vzpostavitev podploskev z mladjem. Če je naravnih pomladitvenih jeder 20 ali manj, uporabimo vsa.

Znotraj vsakega naravnega pomladitvenega jedra postavimo podploskev za monitoring mladja s površino 1 m², ki jo označimo s kovinskimi palicami. Palice na vsakem oglišču podploskve zapičimo v tla, kolikor je mogoče globoko, da jih ne bi odstranile živali. Vrhove palic za boljšo vidnost pobarvamo.

6.3 Vzdrževanje ploskve

6.3.1 Splošno vzdrževanje

Označbe dreves in podploskev redno (vsaki dve leti) pregledujemo in po potrebi popravimo.

6.3.2 Nadomeščanje dreves

Če opazovano drevo odmre ali se v okviru gospodarjenja poseka, ga moramo nadomestiti. Izberemo ustrezno drevo, ki je najbližje odmrlemu in izpolnjuje zahtevo po najmanjši oddaljenosti od najbližjega opazovanega drevesa 30 m. Nadomestno drevo se označi z naslednjo prosto številko, višjo od 50, tj. 51, 52, 53 itd., da ga lahko jasno ločimo od prvotno izbranih 50 dreves.

Če ima drevo poškodovano krošnjo, na primer zaradi vetroloma, žledoloma ali snegoloma, a lahko še obrodi, ga v monitoringu obdržimo. Vzrok poškodbe je potrebno zabeležiti, saj poškodbe krošnje lahko vplivajo na ugotovljene vrednosti verifikatorjev in dodatnih informacij. Če je škoda prehuda in obrod ni več pričakovan, moramo opazovano drevo nadomestiti. Če je v sestoji prisoten jesenov ožig, drevesa opazujemo, dokler ne dosežejo 6. faze, kot je opisana v dodatni informaciji Odmiranje krošnje. Potem se jih nadomesti.

7 Popis verifikatorjev in dodatnih informacij

Verifikatorje in dodatne informacije na ploskvi za monitoring redno popisujemo. Z verifikatorji spremljamo genetske lastnosti populacije ter njeno prilagajanje okoljskim spremembam in/ali upravljanju okolja, dodatne informacije pa popisujemo za lažje tolmačenje verifikatorjev.

Pri popisu verifikatorjev na višjih ravneh (standardna, napredna) moramo popisati tudi podatke za nižje ravni (osnovna, standardna). Pri popisu dodatnih informacij to ni potrebno.

Preglednica 1: Seznam verifikatorjev in dodatnih informacij s kratkim opisom in pogostostjo opazovanja za terensko popisovanje na ploskvah za monitoring jesena.

Ime	Osnovna raven	Standardna raven	Napredna raven
Mortaliteta/ preživetje	Štetje preostalih označenih dreves vsakih 10 let in po vsakem ekstremnem vremenskem pojavu/motnji	Enaka kot osnovna raven	Enaka kot osnovna raven
	Naravno mladje: /	Štetje preostalega mladja na podploskvah za monitoring mladja, dvakrat na desetletje	Enaka kot standardna raven
Verifikatorji	Cvetenje	Opazovanje na ravni posameznih dreves, ob dveh obilnih cvetenjih na desetletje, najboljše v enakomernih časovnih razmikih*	Opazovanje na ravni posameznih dreves, ob dveh obilnih cvetenjih na desetletje, najboljše v enakomernih časovnih razmikih*
	Obrod	Opazovanje na ravni posameznih dreves, v istem letu kot ocena cvetenja na standardni ravni (ne glede na jakost obroda)*	Štetje plodov, v istem letu kot ocena cvetenja na napredni ravni, ne glede na jakost obroda* Za vsak ocenjeni obrod na napredni ravni naberemo semena za laboratorijske analize
	Obilnost mladja	Ocena na ravni sestoja, vsako leto	Štetje mladja ustrezne starosti na podploskvah z mladjem v 2. in nato v 7. letu po vsakem ocenjenem obrodu**
Dodatne informacije	Porazdelitev debelinskih razredov	/	Meritev vsakih 10 let
	Porazdelitev višinskih razredov	/	Meritev vsakih 10 let
	Razmerje med spoli	/	Opazovanje na ravni posameznih dreves, istočasno kot za verifikator Cvetenje
	Odmiranje krošnje	Opazovanje na ravni posameznih dreves, vsako leto	Enaka kot osnovna raven
	Olistanje	/	Opazovanje na ravni posameznih dreves, vsakih 5 let
	Senescenca	/	Opazovanje na ravni posameznih dreves, vsakih 5 let
	Usklajenost cvetenja	/	/

* Najbolje je, da vsako desetletje ocenimo vsaj en obilen obrod. Vendar pa vsakemu obilnemu cvetenju ne sledi nujno obilen obrod. Če ocenjenemu cvetenju ne sledi obilen obrod, moramo oceno cvetenja in obroda ponoviti ob naslednjem obilnem cvetenju, ne glede na to, koliko časa preteče med zaporednima obilnima cvetenjema. Obilno cvetenje in obrod prepoznamo z opazovanjem na osnovni ravni.

** Seme jesena je dormantno; dormanca običajno traja dve zimi. Zato obilnost mladja prvič popišemo dve leti po obilnem obrodu. Če je dormanca semena v opazovanem sestoju jesena drugačna, moramo leta opazovanja prilagoditi trajanju dormance.

7.1 Protokoli za popis verifikatorjev

7.1.1 Mortalitet/preživetje

Mortaliteta opisuje mortaliteto odraslih dreves in naravnega mladja. Nasprotni pojem, preživetje, pomeni drevesa, ki so od zadnje ocene še živa. Oba parametra se izražata v relativnih enotah, tj. deležu odmrlih oziroma preživelih dreves. Preživetje izračunamo s formulo $1 - \text{mortaliteta}$.

7.1.1.1 Odrasla drevesa: osnovna, standardna in napredna raven

Verifikator mortaliteta odraslih dreves ocenimo tako, da preštejemo preostala živa označena drevesa vsakih 10 let in po vsakem ekstremnem vremenskem pojavu/motnji. Mortalitet je razlika med začetnim številom označenih dreves in številom še živih dreves izmed prvotnih 50.

7.1.1.2 Mladje: standardna in napredna raven

Mortaliteto mladja izračunamo iz ocen verifikatorja Obilnost mladja (razdelek 7.1.4). Mortalitet je razlika med začetnim številom mladja in številom še živega mladja ob vsakem naslednjem štetju. Za vsako ocenjevanje obilnosti mladje najprej preštejemo v letu kalitve in nato 5 let kasneje na standardni ravni, na napredni ravni pa še 10 in 15 let kasneje. Na standardni ravni za vsako ocenjevanje izračunamo mortaliteto po petih letih, na napredni ravni pa še po 10 in 15 letih. Obilnost mladja se ocenjuje dvakrat na desetletje, najbolje približno vsakih pet let.

7.1.2 Cvetenje

Ta verifikator opisuje jakost cvetenja in delež dreves, ki cvetijo. Popišemo ga lahko hkrati z dodatno informacijo 7.2.3, Razmerje med spoli, v času cvetenja, v srednji Evropi od marca do aprila. Cvetenje je zgodnejše, če je bila zima mila.

7.1.2.1 Osnovna raven

Ta verifikator popišemo vsako leto na ravni sestoja. Popis opravimo, ko je cvetenje v polnem zamahu. Povprečno stanje ocenimo po pregledu celotne ploskve za monitoring. Zabeležimo dva rezultata, enega za jakost cvetenja, izraženega kot povprečni delež krošnje s cvetovi, in drugega za delež cvetočih dreves v sestoji.

Šifra	Jakost cvetenja na ravni sestoja	Povprečni delež krošnje s cvetovi (%)
1	Brez cvetenja: na drevesih ni cvetov ali so cvetovi le ponekod.	0–10
2	Šibko cvetenje: na drevesih je nekaj cvetov.	> 10–30
3	Zmerno cvetenje: na drevesih je zmerno število cvetov.	> 30–60
4	Močno cvetenje: na drevesih je veliko število cvetov.	> 60–90
5	Masivno cvetenje: na drevesih je ogromno število cvetov.	> 90

Šifra	Delež dreves v sestoji z navedeno jakostjo cvetenja (%)
1	0–10
2	> 10–30
3	> 30–60
4	> 60–90
5	> 90

7.1.2.2 Standardna raven

Ta verifikator popišemo ob dveh obilnih cvetenjih na desetletje, najbolje v enakomernih časovnih razmikih. Popišemo ga na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves. Cvetenje je obilno, ko je na osnovni ravni ocenjeno kot močno ali masivno (šifra 4 ali 5) in je delež dreves z navedeno stopnjo jakosti cvetenja večji od 60 % (šifra 4 ali 5). Popis opravimo, ko je cvetenje v polnem zamahu. Za vsako drevo navedemo en rezultat.

Šifra	Jakost cvetenja	Delež krošnje s cvetovi (%)
1	Brez cvetenja: na drevesu ni cvetov ali so cvetovi le ponekod.	0–10
2	Šibko cvetenje: na drevesu je nekaj cvetov.	> 10–30
3	Zmerno cvetenje: na drevesu je zmerno število cvetov.	> 30–60
4	Močno cvetenje: na drevesu je veliko število cvetov.	> 60–90
5	Masivno cvetenje: na drevesu je ogromno število cvetov.	> 90

7.1.2.3 Napredna raven

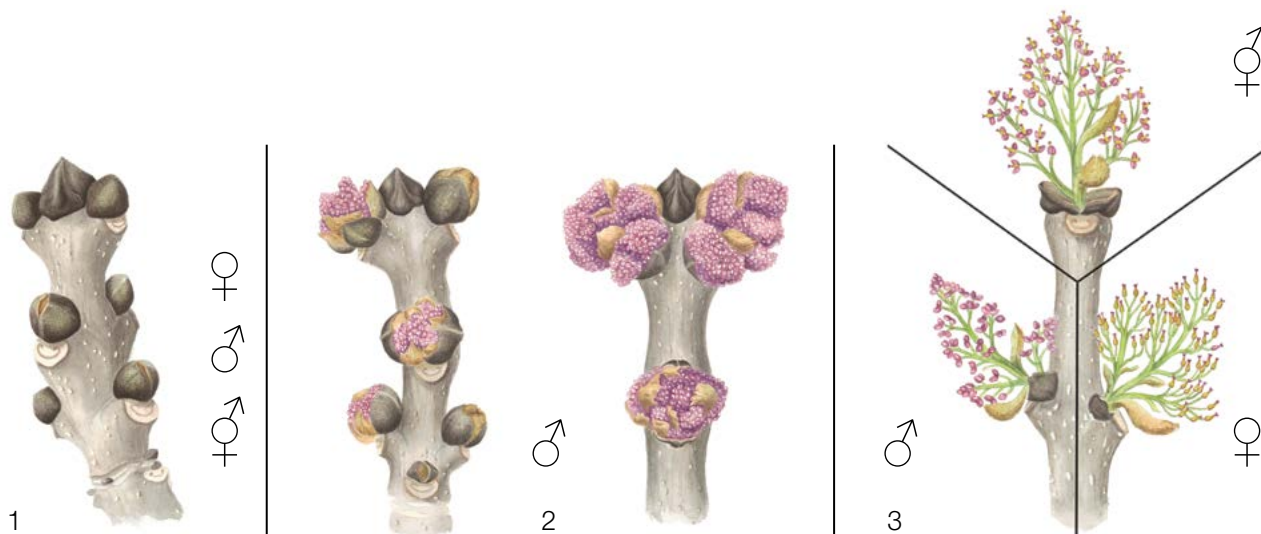
Ta verifikator popišemo ob dveh obilnih cvetenjih na desetletje, najbolje v enakomernih časovnih razmikih. Popišemo ga na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves. Cvetenje je obilno, ko je na osnovni ravni ocenjeno kot močno ali masivno (šifra 4 ali 5) in je delež dreves z navedeno stopnjo jakosti cvetenja večji od 60 % (šifra 4 ali 5). Povprečno sta potrebna dva obiska ploskve, prvi dovolj zgodaj, da opazujemo zgodnje faze cvetenja, in drugi, ko je cvetenje v polnem razmahu.

Za vsako drevo navedemo tri rezultate: faza ženskega cvetenja, faza moškega cvetenja in delež krošnje s cvetovi. Delež krošnje s cvetovi se nanaša na skupno število socvetij (moška + ženska + dvospolna) na drevesu.

Dodatno informacijo Usklajenost cvetenja lahko ocenimo na podlagi rezultatov za fazo cvetenja in dodatno informacijo 7.2.3, Razmerje med spoli.

Šifra	Faza cvetenja
1	Brsti so zaprti, opaziti je nabrekanje brstov, vendar prašniki/pestiči še niso vidni
2	Brsti so odprti, prašniki/pestiči so vidni, vendar še ne trosijo peloda/niso receptivni
3	Socvetja so polno odprta, prašniki sproščajo pelod, pestiči so receptivni

Šifra	Delež krošnje s cvetovi (%; moška, ženska in dvospolna socvetja skupaj)
1	0 – 10
2	> 10 – 30
3	> 30 – 60
4	> 60 – 90
5	> 90



Slika 5: Slikovni vodnik za opisovanje faz cvetenja na napredni ravni verifikatorja Cvetenje. Pri 3. fazi je socvetje, ki raste iz terminalnega brsta, prikazano le za ponazoritev; v resnici se iz terminalnega brsta razvijajo listi.

7.1.3 Obrod

Ta verifikator opisuje prisotnost plodov in njihovo obilnost. Podatke za ta verifikator zbiramo v času obroda, v srednji Evropi od avgusta do oktobra.

7.1.3.1 Osnovna raven

Ta verifikator popišemo vsako leto na ravni sestoja. Povprečno stanje ocenimo po pregledu celotne ploskve za monitoring. Zabeležimo dva rezultata, enega za jakost obroda in drugega za delež dreves v sestoji, ki so obrodila.

Šifra	Jakost obroda na ravni sestoja	Povprečni delež krošnje s plodovi (%)
1	Brez obroda: na drevesih ni plodov ali so plodovi le ponekod.	0–10
2	Šibek obrod: na drevesih je nekaj plodov.	> 10–30
3	Zmeren obrod: na drevesih je zmerna količina plodov.	> 30–60
4	Močen obrod: na drevesih je veliko plodov.	> 60–90
5	Masiven obrod: na drevesih je ogromno plodov.	> 90

Šifra	Delež dreves v sestoji z navedeno jakostjo obroda (%)
1	0–10
2	> 10–30
3	> 30–60
4	> 60–90
5	> 90

7.1.3.2 Standardna raven

Ta verifikator popišemo v istih letih kot oceno cvetenja na standardni ravni (ne glede na jakost obroda). Popišemo ga na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves. Popis opravimo, preden plodovi začnejo odpadati. Za vsako drevo navedemo en rezultat.

Najbolje je, da po opaženih obilnih cvetenjih zajamemo vsaj en obilen obrod na desetletje. Vendar pa vsakemu obilnemu cvetenju ne sledi nujno obilen obrod. Če ocenjenemu cvetenju ne sledi obilen obrod, moramo oceno cvetenja in obroda ponoviti ob naslednjem obilnem cvetenju, ne glede na to, koliko časa preteče med zaporednima obilnima cvetenjema. Obilen obrod prepoznamo z opazovanjem na osnovni ravni. Obrod je obilen, ko je na osnovni ravni ocenjen kot močen ali masiven (šifra 4 ali 5) in je delež dreves z navedeno jakostjo obroda večji od 60 % (šifra 4 ali 5).

Šifra	Jakost obroda	Delež krošnje s plodovi (%)
1	Brez obroda: na drevesu ni plodov ali so plodovi le ponekod.	0–10
2	Šibek obrod: na drevesu je nekaj plodov.	> 10–30
3	Zmeren obrod: na drevesu je zmerna količina plodov.	> 30–60
4	Močen obrod: na drevesu je veliko plodov.	> 60–90
5	Masiven obrod: na drevesu je ogromno plodov.	> 90

Popis tega verifikatorja nam posredno pove, ali je drevo funkcionalno žensko ali moško, in omogoča opazovanje spreminjanja funkcionalnega spola skozi čas.

7.1.3.3 Napredna raven

Ta verifikator popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves, v istih letih kot oceno cvetenja na napredni ravni, ne glede na jakost obroda. Popis opravimo, preden plodovi začnejo odpadati. Za vsako drevo navedemo en rezultat in zabeležimo kateri del krošnje smo opazovali. Obenem nabereмо seme za analizo semen in genetsko analizo za verifikatorje in dodatne informacije na napredni ravni.

Najbolje je, da po opaženih obilnih cvetenjih zajamemo vsaj en obilen obrod na desetletje. Vendar pa vsakemu obilnemu cvetenju ne sledi nujno obilen obrod. Če ocenjenemu cvetenju ne sledi obilen obrod, moramo oceno cvetenja in obroda ponoviti ob naslednjem obilnem cvetenju, ne glede na to, koliko časa preteče med zaporednima obilnima cvetenjema. Obilen obrod prepoznamo z opazovanjem na osnovni ravni. Obrod je obilen, ko je na osnovni ravni ocenjen kot močen ali masiven (šifra 4 ali 5) in je delež dreves z navedeno stopnjo jakosti obroda večji od 60 % (šifra 4 ali 5).

Verifikator popišemo tako, da preštujemo plodove. Pri tem si pomagamo z daljnogledom. Uporabimo povprečni rezultat treh zaporednih štetij. Rezultat vsakega štetja je število plodov, ki jih opazovalec prešteje v 30 sekundah. Pri vseh drevesih moramo preučevati isti del krošnje. Ko izberemo del krošnje, ki ga bomo opazovali, moramo ob vsakem naslednjem spremljanju tega verifikatorja izbrati isti del krošnje. Zgornja tretjina krošnje je za štetje ustrežnejša od spodnjega in srednjega dela.

Zabeležimo dve vrednosti, število plodov in opazovani del krošnje.

Število plodov, prešteti v 30 sekundah (povprečje 3 štetij)

X

Šifra Opazovani del krošnje

1 Spodnji

2 Srednji

3 Zgornji

7.1.4 Obilnost mladja

Ta verifikator opisuje prisotnost in obilnost mladja na ploskvi za monitoring.

7.1.4.1 Osnovna raven

Ta verifikator popišemo na ravni sestoja, jeseni vsako leto. Za oceno uporabimo strokovno mnenje glede na stanje na celotni ploskvi za monitoring. Zabeležimo dve vrednosti, eno za novo naravno mladje (mladje, ki je vzkalilo v istem letu kot se opravlja opazovanje) in eno za starejše mladje (mladje, starejše od enega leta).

Šifra Opis: novo mladje (mladje starosti do enega leta)

1a Na ploskvi za monitoring ni novega mladja ali ga je zelo malo

2a Na ploskvi za monitoring je zadostna količina novega mladja

Šifra Opis: starejše naravno mladje (mladje starejše od enega leta)

1b Na ploskvi za monitoring ni starejšega mladja ali ga je zelo malo

2b Na ploskvi za monitoring je zadostna količina starejšega mladja

7.1.4.2 Standardna raven

Ta verifikator popišemo tako, da preštejemo mladje starosti do enega leta v 2. (jeseni dve leti po obilnem obrodu; leto obroda štejejo kot leto 0) in nato isto mladje (staro 5 let) v 7. letu po obrodu, saj jesenova semena običajno dve zimi mirujejo v tleh.

Štetje mladja:

Po vzpostavitvi podploskev za monitoring mladja moramo prešteti vse mladje jesena starosti do enega leta na vsaki izmed 20 podploskev. Starejšega jesenovega mladja na podploskvah ne štejejo. Pri naslednjem štetju štejejo samo mladje ustrezne starosti, npr. v 7. letu po obrodu štejejo petletno mladje.

Rezultat štetja mladja na podploskvi

X

Mortaliteto/preživetje mladja izračunamo iz števil, zabeleženih za ta verifikator.

Če je dormanca semena v opazovanem sestoju jesena drugačna, moramo vzpostavitev podploskev naravnega mladja in začetek opazovanja prilagoditi trajanju dormance.

Vzpostavitev podploskev je opisana v razdelku 6.2, Vzpostavitev podploskev za monitoring mladja.

7.1.4.3 Napredna raven

Ta verifikator popišemo tako, da na vsaki od 20 podploskev z mladjem preštejemo mladje 2. jesen po vsakem ocenjenem obrodu (leto obroda štejejo kot leto 0) ter nato 7., 12. in 17. leto po tem obrodu, saj jesenova semena običajno dve zimi mirujejo v tleh. Pri vsakem štetju štejejo samo mladje ustrezne starosti: 2. jesen mladje starosti do enega leta, 7. jesen 5-letno mladje, 12. jesen 10-letno mladje itn.

Če je dormanca semena v opazovanem sestoju jesena drugačna, moramo leta opazovanja prilagoditi trajanju dormance.

Preglednica 2: Časovni potek ocenjevanja obilnosti mladja. V spodnjem primeru se prvi ocenjeni obrod zgodi v 2. letu monitoringa; glede na dve zimi trajajočo dormanco semena jesena se tako v 4. letu desetletja monitoringa vzpostavi 20 podploskev za monitoring mladja. Naslednja ocena obroda se opravi v 8. letu monitoringa. Glede na dormanco semena jesena se v 10. letu vzpostavi novih 20 podploskev za monitoring mladja. Po vsakem ocenjenem obrodu se vzpostavi novih dvajset podploskev. Monitoring obilnosti mladja se za vsako skupino 20 podploskev opravi vsakih pet let. Obrodi, iz katerih je zrastle ocenjevano mladje, in časovni potek ocenjevalnih dejavnosti so obarvani z enako barvo. Po zadnjem številu mladja se monitoring obilnosti mladja na ustrezni skupini podploskev ustavi in podploskve se ukinejo. S – standardna raven; N – napredna raven.

Leto monitoringa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
Obrod		•			•	•		•		•		•		•			•	•		•		•		•		
Ocena mladja za 1. ocenjeni obrod [leta]	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23		
Vzpostavitev podploskev z mladjem				SN																						
Štetje obilnosti mladja				SN					SN					N						N						
Ocena mladja za 2. ocenjeni obrod									0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Vzpostavitev podploskev z mladjem											SN															
Štetje obilnosti mladja											SN				SN							N				N

Mortaliteto/preživetje mladja izračunamo iz števil, zabeleženih za ta verifikator.

Vzpostavitev podploskev z mladjem je opisana v razdelku 6.2, Vzpostavitev podploskev za monitoring mladja, štetje pa v razdelku 7.1.4.2, Standardna raven.

7.2 Protokoli za popis dodatnih informacij

7.2.1 Porazdelitev debelinskih razredov

7.2.1.1 Standardna in napredna raven

Prsni premer popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves, vsakih 10 let. Prsni premer je premer debla na višini 1,30 m, tj. približno v višini prsi odraslega človeka. Če ima drevo več kot eno deblo, izmerimo vsa in zabeležimo povprečno vrednost (vendar se skušamo izogniti drevesom s številnimi majhnimi debli). V opombe zapišemo, da je drevo večdebello, in zabeležimo število izmerjenih debel. Če je drevo nagnjeno, prsni premer izmerimo pravokotno na drevesno deblo. Prsni premer lahko izmerimo na dva načina:

- 1) s premerko: v tem primeru izmerimo dva premera, pravokotno eden na drugega, in izračunamo povprečje;
- 2) z meritvijo obsega drevesa, iz katerega izračunamo premer (delimo ga s številom π , $\sim 3,14$), ali s pi-metrom.

Prsni premer beležimo v cm. Pri vsakem naslednjem merjenju moramo uporabiti isto merilno metodo.

7.2.2 Porazdelitev višinskih razredov

7.2.2.1 Standardna in napredna raven

Višino popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves, vsakih 10 let. Višino izmerimo od tal do najvišjega dela krošnje, najbolje s klinometrom ali višinomermom (npr. Vertex). Višino beležimo v metrih na eno decimalno mesto natančno. Če je krošnja poškodovana, moramo v opombe zapisati tudi to, skupaj z razlogom poškodbe.

7.2.3 Razmerje med spoli

Ta dodatna informacija opisuje spol posameznih jesenovih dreves in razmerje med njimi. Popišemo ga lahko hkrati z verifikatorjem 7.1.3, Cvetenje, v času cvetenja – v srednji Evropi od marca do aprila.

7.2.3.1 Standardna raven

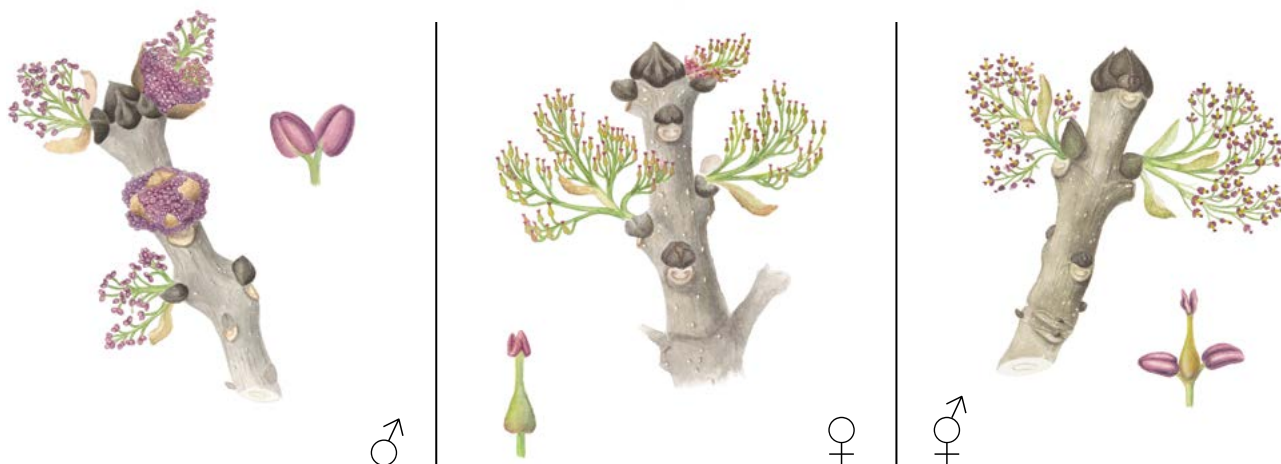
Na standardni ravni se ta dodatna informacija popisuje na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves, istočasno kot verifikator Cvetenje. Moška, ženska in dvospolna socvetja so prikazana na Sliki 6.

Šifra	Spol	Opis
1	Moški	Več kot polovica vseh socvetij na drevesu je moških.
2	Ženski	Več kot polovica vseh socvetij na drevesu je ženskih.
3	Dvospolno drevo	Več kot polovica vseh socvetij na drevesu je dvospolnih.

7.2.3.2 Napredna raven

Na napredni ravni se ta dodatna informacija popisuje na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves, istočasno kot verifikator Cvetenje. Odstotni delež moških, ženskih in dvospolnih socvetij zabeležimo za vsako opazovano drevo z 10-odstotno natančnostjo. Moška, ženska in dvospolna socvetja so prikazana na Sliki 6.

Šifra	Spol
1	% moških socvetij
2	% ženskih socvetij
3	% dvospolnih socvetij

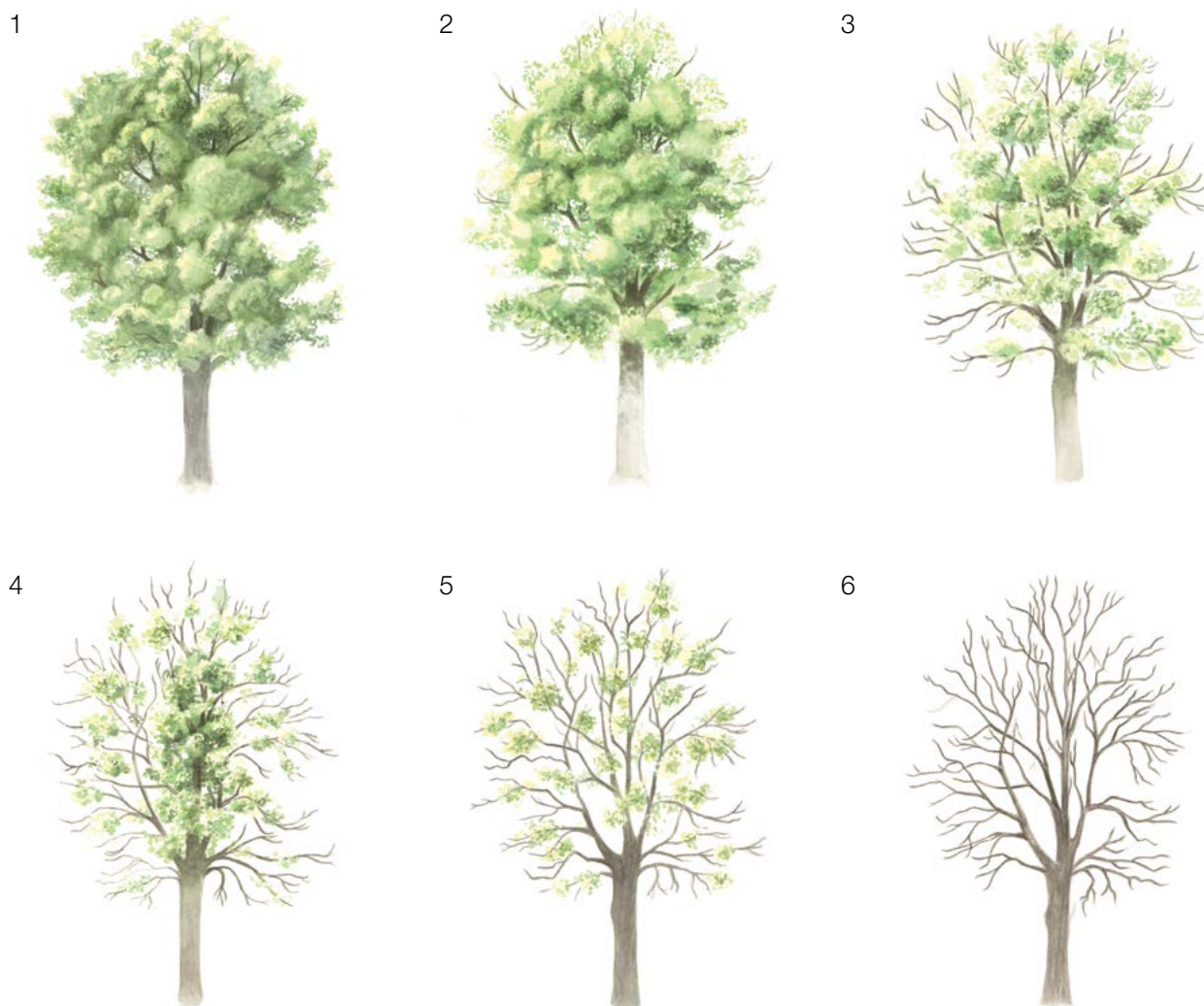


Slika 6: Slikovni vodnik za socvetja *F. excelsior* za določitev razmerja med spoli.

Drevesa s socvetji na vmesni stopnji med ženskimi in dvospolnimi, ki imajo majhne prašnice in lahko trosijo pelod ali ne, je težko opredeliti. Če je več socvetij ženskih, lahko drevo opredelimo kot žensko, če je več socvetij dvospolnih, pa kot dvospolno.

7.2.4 Odmiranje krošnje

Ta dodatna informacija opisuje stanje krošnje zaradi jesenovega ožiga. Verifikator popišemo vsako leto z opazovanjem vseh 50 opazovanih dreves. Najbolje je, da podatke za ta verifikator zbiramo v času, ko so listi polno razviti, npr. julija v srednji Evropi. Stopnje poškodovanosti krošnje zaradi jesenovega ožiga so prikazane na Sliki 7.



Slika 7: Slikovni vodnik za oceno poškodovanosti krošnje zaradi jesenovega ožiga.

7.2.4.1 Osnovna, standardna in napredna raven

Šifra	Opis
1	Zdrava krošnja (0–10 % prezgodaj odpadlega listja)
2	Vidni so mrtvi konci vej na robu krošnje, krošnja sicer v dobrem stanju (11–30 % prezgodaj odpadlega listja)
3	Vidne so mrtve veje na robu krošnje, krošnja je dovolj razredčena, da vidimo skoznjo (31–50 % prezgodaj odpadlega listja)
4	Ob deblu nastaja sekundarna krošnja, vidne so debele veje brez listov, krošnja je zelo razredčena (51–80 % prezgodaj odpadlega listja)
5	Ostal je samo še majhen del krošnje (81–99 % prezgodaj odpadlega listja)
6	Drevo je odmrlo (100 % prezgodaj odpadlega listja)

7.2.5 Olistanje

Olistanje opisuje razvoj mladih listov. Pri jesenu se začne po cvetenju. Popis opravimo samo na standardni in napredni ravni. Podatke za to dodatno informacijo v srednji Evropi zbiramo v aprilu; potrebnih je več obiskov, popis pa se ustavi, ko imajo vsa opazovana drevesa polno razvite liste. Olistanje je zgodnejše, če je bila zima mila.

7.2.5.1 Standardna raven

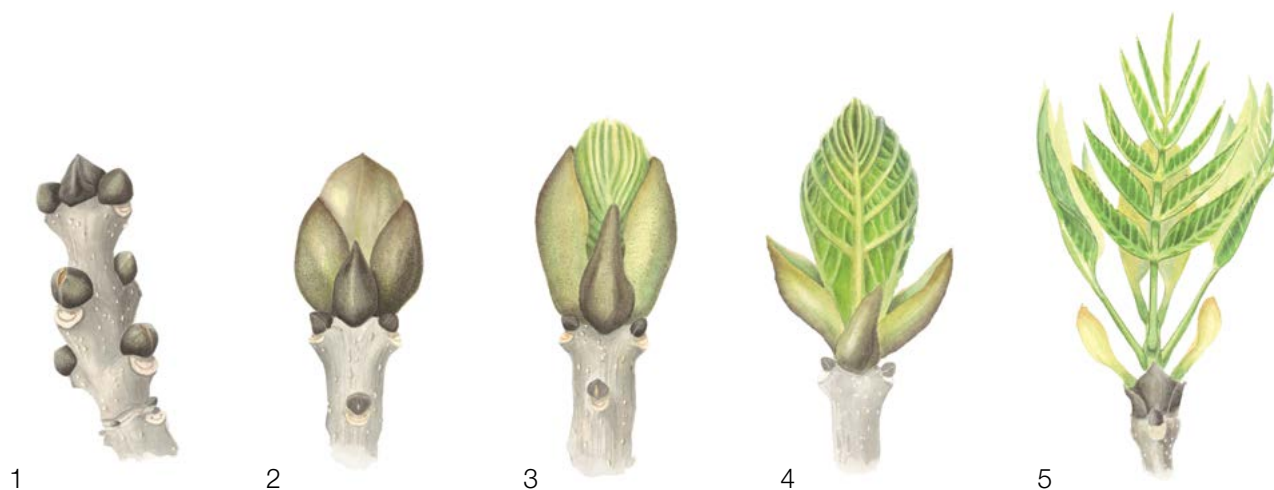
Na standardni ravni olistanje popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves, vsakih pet let. Zanimata nas začetek (3. faza) in konec olistanja (5. faza). Opazovanje se preneha, ko so vsa drevesa dosegla 5. fazo. Običajno je potrebnih šest obiskov. Za vsako drevo zabeležimo dve oceni: faza olistanja in delež krošnje z navedeno fazo olistanja. Faze olistanja prikazuje slika 8.

Šifra	Faza olistanja
1	Speči brsti
2	Brsti nabrekajo, a so še zaprti
3	Brsti se odpirajo
4	Brsti rastejo v dolžino
5	Listi so ločeni in začenjajo navpično rasti

Šifra	Delež krošnje z navedeno fazo olistanja (%)
1	> 0–33
2	> 33–66
3	> 66–99
4	100

7.2.5.2 Napredna raven

Na napredni ravni olistanje popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves, vsako leto, na enak način kot na standardni ravni. Več podrobnosti je v razdelku 7.2.5.1, Standardna raven.



Slika 8: Slikovni vodnik za opisovanje olistanja na standardni in napredni ravni za dodatno informacijo Olistanje.

7.2.6 Senescenca

Senescenca opisuje proces staranja listov. Popis te dodatne informacije opravimo samo na standardni in napredni ravni.

7.2.6.1 Standardna raven

Na standardni ravni senescenco popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves, vsakih pet let. Zanima nas 3. faza, ko so listi rumeni in v njih več ne poteka fotosinteza. Opazovanje se preneha, ko so vsa drevesa dosegla 3. fazo. Običajno sta potrebna dva obiska ploskve. Za vsako drevo zabeležimo tri ocene: faza obarvanosti listov, delež krošnje z navedeno fazo senescence in delež odpadlih listov.

Šifra	Faza obarvanosti listov
1	Listi so popolnoma zeleni
2	Listi so zeleni z rumenimi lisami
3	Listi so popolnoma rumeni
4	Listi so rjavi

Šifra	Delež krošnje z navedeno fazo obarvanosti listov (%)
1	> 0–33
2	> 33–66
3	> 66–99
4	100

Šifra	Delež listov, odpadlih zaradi senescence (%)
1	> 0–33
2	> 33–66
3	> 66–99
4	100

7.2.6.2 Napredna raven

Na napredni ravni senescenco popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves, vsako leto, na enak način kot na standardni ravni. Več podrobnosti je v razdelku 7.2.6.1, Standardna raven.

7.2.7 Usklajenost cvetenja

7.2.7.1 Napredna raven

Usklajenost cvetenja spremljamo samo na napredni ravni na podlagi podatkov, zbranih za verifikator Cvetenje. S to dodatno informacijo ugotavljamo, ali sta moško in žensko cvetenje na spremljani ploskvi časovno usklajeni.

Za vzpostavitev ploskve uporabite obrazec: »GGM - Opis ploskve«

Za popis verifikatorjev uporabite obrazec: »GGM – Terenski verifikatorji«

Za popis dodatnih informacij uporabite obrazec: »GGM – Terenske dodatne informacije«

8. Viri

1. Pliûra A, Heuertz M (2003) EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for common ash (*Fraxinus excelsior*). International Plant Genetic Resources Institute, Rome
2. Beck P, Caudullo G, Tinner W, de Rigo D (2016) *Fraxinus excelsior* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: San-Miguel-Ayanz J, de Rigo D, Caudullo G, Houston Durrant T, Mauri A (ed) European Atlas of Forest Tree Species. Publ. Off. EU, Luxembourg, pp 98-99. DOI: 10.2788/4251
3. FRAXIGEN (2005) Ash species in Europe: biological characteristics and practical guidelines for sustainable use. Oxford Forestry Institute, University of Oxford, UK
4. Ogris N (2020) Varstvo gozdov Slovenije – portal. https://www.zdravgozd.si/meni_index.aspx. Pridobljeno 16 september 2020

Za veljavno znanstveno nomenklaturu vrst so bili uporabljeni sledeči viri:

- a. CABI (2020) Invasive Species Compendium. CAB International, Wallingford, UK. www.cabi.org/isc. Pridobljeno 15 december 2020
- b. EPPO (2020) EPPO Global Database (available online). <https://gd.eppo.int>. Pridobljeno 15 december 2020
- c. GBIF (2020) Global Biodiversity Information Facility. <https://www.gbif.org> Pridobljeno 15 december 2020
- d. IPNI (2020) International Plant Names Index. The Royal Botanic Gardens, Kew, Harvard University Herbaria & Libraries & Australian National Botanic Gardens. <http://www.ipni.org>, Pridobljeno 10 december 2020
- e. National Center for Biotechnology Information (NCBI) (1998) National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, Bethesda (MD). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Pridobljeno 15 december 2020
- f. Stevens PF (2001) Angiosperm Phylogeny Website, Version 14. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Pridobljeno 15 december 2020
- g. The Plant List (2013) Version 1.1. <http://www.theplantlist.org/>. Pridobljeno 12 december 2020
- h. Tropicos.org (2020) Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org>. Pridobljeno 15 december 2020
- i. WFO (2020) World Flora Online. <http://www.worldfloraonline.org>. Pridobljeno 15 december 2020

Smernice za gozdni genetski monitoring

9.2.4 **črnega bora** **(*Pinus nigra* J. F. Arnold)**

Paraskevi ALIZOTI¹, Darius KAVALIAUSKAS², Barbara FUSSI²,
Marjana WESTERGREN³, Marko BAJC³, Phil ARAVANOPOULOS¹,
Rok DAMJANIĆ³, Hojka KRAIGHER³

Ilustracije: Klara JAGER



Navedba: Alizoti in sod. (2020) Smernice za gozdni genetski monitoring črnega bora (*Pinus nigra* J. F. Arnold). V: Bajc in sod. (ur.) Priročnik za gozdni genetski monitoring. Gozdarski inštitut Slovenije: Založba Silva Slovenica, Ljubljana, str. 215-233. <http://dx.doi.org/10.20315/SFS.168>

Povezane ustanove:

- ¹ Aristotelova univerza v Solunu (AUTH), Grčija
- ² Bavarski urad za gozdno genetiko (AWG), Nemčija
- ³ Gozdarski inštitut Slovenije (GIS), Slovenija

1 Povzetek

Črni bor (*Pinus nigra* J. F. Arnold) je vetrocveten, enodomen, večinoma alogamen iglavec, ki raste na višjih nadmorskih višinah okrog Sredozemlja, pa tudi v Avstriji, na Krimskem polotoku in ob Črnem morju. Ker je vrsta zelo razširjena v številnih različnih okoljih, se je morfološko in genetsko diferencirala. Na njenem naravnem območju razširjenosti tako prepoznamo pet interfertilnih podvrst. Črni bor je pomembna nosilna vrsta z velikim ekonomskim in ekološkim pomenom, ki ima visokokakovosten in naravno trpežen les. Dobro prenaša abiotški stres, na primer revna in slana tla, pozebo, težo žleda, močen veter in sušo. Vrsta se v gozdnih ekosistemih naravno obnavlja, vendar nima mehanizmov za obnovo po požarih, zato je zelo občutljiva za velike požare v naravi, ki so v Sredozemlju pogosti. Vrsta je zaradi svojega velikega ekonomskega in ekološkega pomena, široke naravne razširjenosti v raznolikih habitatih ter obstoja izoliranih in marginalnih populacij, ki bi bile lahko ogrožene zaradi podnebnih sprememb, dober kandidat za genetski monitoring.

V teh smernicah so na kratko opisani črni bor, njegovo razmnoževanje, okolje in ogrožujoči dejavniki. Smernice vsebujejo tudi napotke za vzpostavitev ploskve za genetski monitoring in popis vseh terenskih verifikatorjev in dodatnih informacij.

2 Opis vrste

Črni bor je sredozemski iglavec, ki raste tudi v Avstriji, na Krimskem polotoku in ob Črnem morju. Zlasti na podlagi morfoloških/anatomskih lastnosti lahko prepoznamo naslednjih [1] pet podvrst: a) *P. nigra* J. F. Arnold subsp. *nigra*, razširjen v jugovzhodni Avstriji, severni Italiji, na Balkanu, v Bolgariji, Romuniji in evropskem delu Turčije; b) *P. nigra* subsp. *dalmatica* (Vis.) Franco, razširjen na Hrvaškem; c) *P. nigra* subsp. *laricio* (Poir.) palib. ex Maire, razširjen v Franciji (Korzika) in Italiji (Apenini, Sicilija); d) *P. nigra* subsp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe, razširjen v Grčiji, na Cipru, v jugozahodni Bolgariji, jugovzhodni Severni Makedoniji, južni Albaniji in od Krimskega polotoka ob obali Črnega morja do Turčije; e) *P. nigra* subsp. *salzmannii* (Dunal) Franco, razširjen v jugozahodni Evropi, Franciji (Hérault, Pireneji), Španiji, Alžiriji in Maroku. Vrsta raste v asociacijah z rdečim borom (*Pinus sylvestris* L.), rušjem (*Pinus mugo* Turra), alepskim borom (*Pinus halepensis* Mill.), pinijo (*Pinus pinea* L.) in muniko (*Pinus heldreichii* Christ) [2]. V večini primerov tvori čiste sestoje, najdemo pa jo tudi v mešanih sestojih z drugimi bori, zlasti z rdečim borom [12].

(a)



(b)



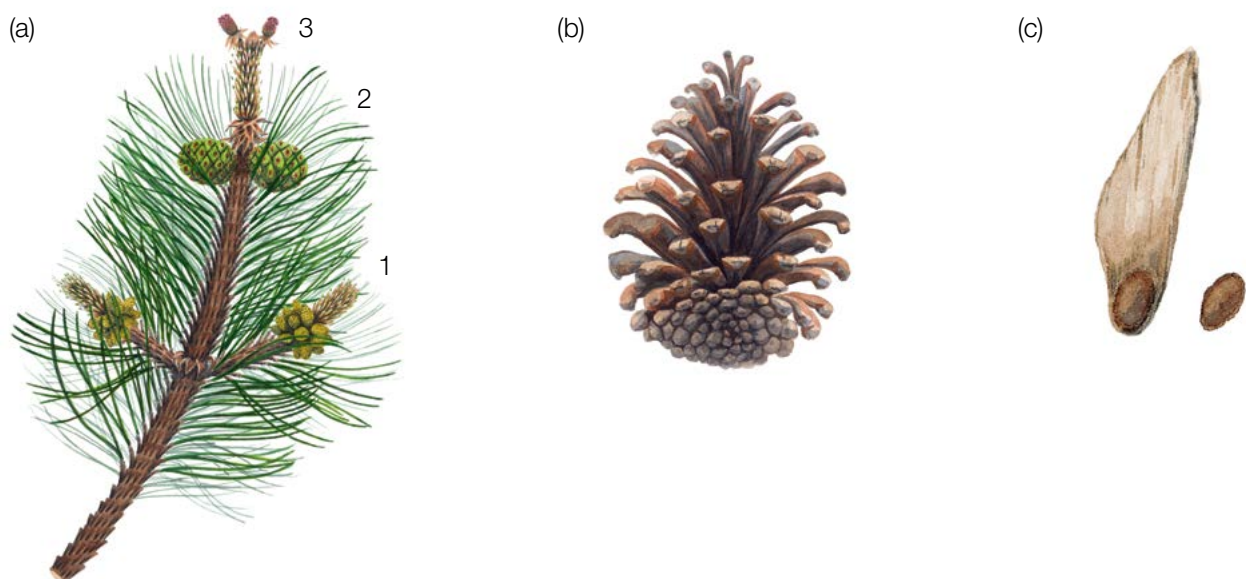
Slika 1: Habitus (a) in iglici (b) vrste *Pinus nigra*.

Naravna interspecifična hibridizacija med vrsto *Pinus nigra* in drugimi vrstami borov, na primer *P. sylvestris*, *P. heldreichii*, *P. densiflora* Siebold & Zucc., *P. resinosa* Aiton, *P. tabulaeformis* Carrière, *P. taiwanensis* Hayata, *P. mugo* in *P. thunbergii* Parl., je bila opažena [3, 4, 5, 6, 7] tam, kjer te vrste naravno rastejo skupaj s črnim borom ali so umetno naseljene. Medvrstna hibridizacija med podvrstami je mogoča, saj so reproduktivne bariere za medsebojno izmenjavo genov šibke. Tako nastanejo prehodne oblike, ki so rezultat močnega genskega toka ob raznosu peloda na velike razdalje [8].

Vrsta je srednje velik bor s po dvema iglicama (Slika 1), ki v sečni zrelosti (80 let) doseže višino 30–50 m in ima ravno deblo. Lubje je svetlo sive do temno sivo rjave barve in pri starejših drevesih na široko razpoka na luskaste ploskve [9]. S staranjem postaja vse bolj razbrazdano [10]. Krošnja je v mladosti piramidne oblike, s starostjo pa postane bolj okrogla in oblikuje širok ploščat vrh ali obok. Igljice so trde, dolge 8–16 cm in široke 1–2 mm, ravne ali ukrivljene in fino nazobčane, listna nožnica je dolga 10–12 mm [11, 12].

3 Razmnoževanje

Črni bor je enodomen anemofilen iglavec s krilatimi semeni, ki jih raznaša veter. Razmnoževalno zrelost doseže v starosti 15–20 let. Moški in ženski strobili (storžki) se pojavijo maja vsako leto. Ženski strobili (storžki) (Slika 2a) so rdeči do vijoličasti, moški pa so najprej zeleni in postopno postanejo rumeni, ko dozori in trosijo pelod. Sproščanje peloda in receptivnost ženskih storžkov se pojavita od maja do začetka junija. Obdobje receptivnosti storžkov običajno traja tri dni [8]. Oploditev se zgodi 13 mesecev po opraitvi. Zreli storži (Slika 2b) so sedeči in rastejo vodoravno, dolgi so 4–8 cm in široki 2–4 cm, njihova barva je rjava do rumeno rjava ali celo svetlo rumena. Dozorijo od septembra do novembra drugo leto, odprejo se tretje leto po opraitvi [12]. Vsaka plodna luska storža običajno tvori dve krilati semeni (Slika 2c). Storži proizvedejo po 30–40 semen, od katerih je skoraj polovica kalivih. Seme izpada od oktobra do novembra v drugi rastni sezoni. Seme je lahko sivo do svetlo rumeno, dolgo 5–7 mm. Krilca so dolga 19–26 mm. Semensko leto je na od tri do pet let [13].



Slika 2: Veja drevesa črnega bora z moškimi strobili (a-1), ženskimi nezrelimi prvoletnimi storžki (a-2) in letošnjimi storžki (a-3), zrel odprt storž (b) ter seme s krilcem in brez (c).

4 Okolje

Črni bor ima široko naravno območje razširjenosti (v Sredozemlju, pojavlja pa se tudi v Avstriji, na Krimskem polotoku in ob Črnem morju), ki vključuje številna raznolika okolja. Raste na nadmorskih višinah od 350 do 2200 m (gorovje Taurus), optimalna nadmorska višina za rast pa je med 800 in 1500 m. Vrsta lahko uspeva v suhih okoljih z revnimi tlemi in na različnih substratih, od apnenca do dolomita ter kislih ali vulkanskih tal [8]. Za večino območja razširjenosti črnega bora je značilno sredozemsko podnebje. Razpon bioklimatskih razmer lahko sega od vlažnih do polvlažnih in polsušnih. Na nekaterih delih naravnega območja razširjenosti vrsta raste v zmernih hladnih in mrzlih podnebjih. Severne populacije so odporne na pozebo in prenesejo temperature do $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, medtem ko južne populacije vzdržijo do $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ [2]. Fotosintezo so opazili celo pri $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$, pri $-19\text{ }^{\circ}\text{C}$ je bilo še zaznavno dihanje [2, 14]. Vrsta dobro prenaša tudi težo žleda in v splošnem velja za trdoživo. Črni bor je svetloljuben in ne prenese sence, dobro pa prenaša veter, sušo in slana tla.

5 Ogroženost

Zlasti kadar raste v izoliranih populacijah, lahko vrsto ogroža več dejavnikov, ki lahko povzročijo izumrtje populacije, na primer požari, žuželke in bolezni, nezakonita sečnja ter splošna grožnja podnebnih sprememb. Črni bor lahko napadejo žuželke, kot so borov zavijač (*Rhyacionia buoliana* Denis & Schiffermüller), pinijev sprevodni prelec (*Thaumetopoea pityocampa* Denis & Schiffermüller), zapredkarica borovih nasadov (*Acantholyda hieroglyphica* Christ), navadna borova grizlica (*Diprion pini* L.), *Pissodes validirostis* L., *Marchalina hellenica* (*Monophlebus hellenicus*) Gen., borova ogorčica (*Bursaphelenchus xylophilus* Steiner & Buhner) in *Ips pini* Say [8, 15]. Njegove iglice lahko okužijo tudi glive, kot so *Mycosphaerella pini* Rostr. (*Dothistroma pini* Hulbary), *Lophodermella* spp. in *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko & B. Sutton (*Diplodia pinea* (Desm.) J. Kickx f.) [16, 17, 18].

Mešanje genskih skladov po vsej Evropi v zadnjih dveh stoletjih zaradi pogostega sajenja v nasadih z reprodukcijskim materialom neznanega izvora, ki je lahko neustrezno prilagojen lokalnim razmeram, prav tako pomeni nevarnost za genske sklade avtohtonih populacij [8] ter njihov adaptivni in evolucijski potencial.

6 Vzpostavitev in vzdrževanje ploskve

Črni bor je sestojna drevesna vrsta, ki večinoma tvori čiste sestoje, lahko pa raste tudi pomešana z rdečim borom in drugimi iglavci ali listavci [2]. Zato lahko tudi pri črnem boru sledimo običajnemu programu gozdnega genetskega monitoringa (GGM) za sestojne drevesne vrste.

Ploskev za GGM mora sestavljati 50 razmnoževalno zrelih (tj. cvetočih) dreves, izbranih tako, da izpolnjujejo zahtevo po najmanjši razdalji 30 m med katerima koli drevesoma. Drevesa v naravnih rastiščih spolno dozori pri starosti 15–20 let [8]. Če ploskev vzpostavljamo zunaj časa cvetenja, lahko za prepoznavanje potencialnih razmnoževalno aktivnih dreves uporabimo socialni položaj in prsni premer ($\geq 15\text{ cm}$) drevesa, pri čemer se opiramo na strokovno znanje revirnih gozdarjev. Poleg tega moramo pred določitvijo območja za GGM upoštevati prisotnost mladja zadostne gostote, če je potrebna vzpostavitev podploskev mladja za preučevanje vzorcev sistema opravevanja, pretoka genov in stopnje morebitnih sprememb genetske variabilnosti med različnimi generacijami. Izbrana razmnoževalno zrela drevesa na ploskvi moramo označiti in zabeležiti njihove koordinate. Poleg tega moramo izbrati in označiti do 20 podploskev za monitoring mladja za ocenjevanje obilnosti in vzorčenje mladja.

V času vzpostavitve ploskve lahko tudi izmerimo prsni premer in odvzamemo vzorce za ekstrakcijo DNK ter ocenimo cvetenje, če ploskev vzpostavljamo v času cvetenja.

Potrebna oprema:

- naprava za merjenje razdalje (priporoča se daljnogled z laserskim daljinomerom),
- kompas,
- barva in čopič ali pršilka za označevanje dreves,
- maska, zaščitna očala in rokavice za pršenje/označevanje dreves,
- premerka za merjenje prsnega premera,
- naprava GPS, ki je dovolj natančna in omogoča shranjevanje koordinat dreves,
- po potrebi tudi fotografski aparat za fotografiranje, če ploskev vzpostavljamo v času cvetenja.

Pri izoliranih, marginalnih ali ogroženih populacijah te vrste so lahko ploskve za genetski monitoring večje od običajnih. V tem primeru morata biti velikost in oblika ploskve za GGM prilagodljivi, vendar je iz praktičnih razlogov najbolje, da velikost ploskve ne presega 10 ha.

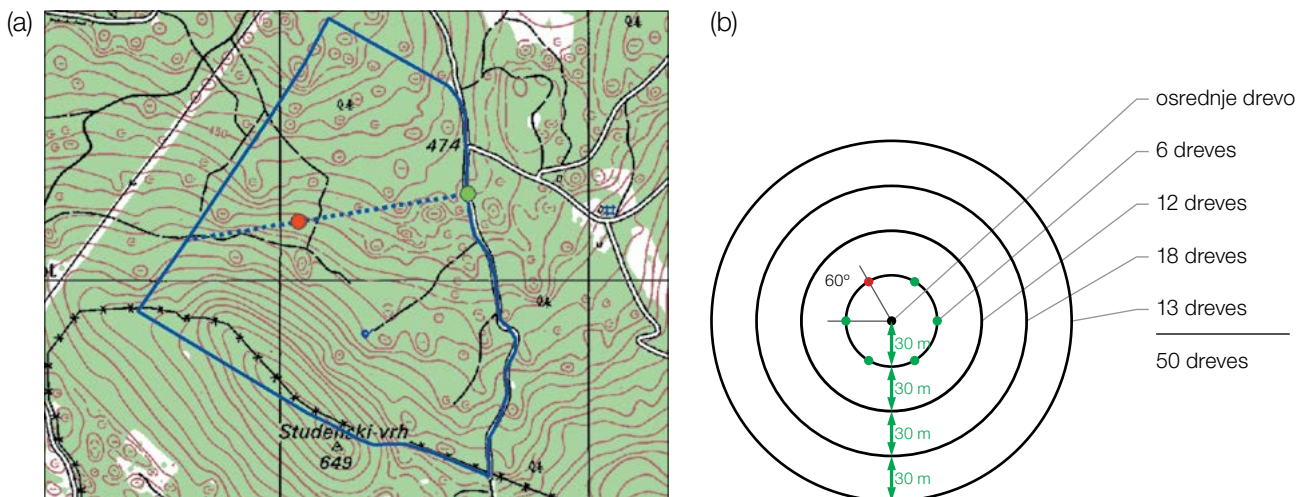
6.1 Vzpostavitev ploskve

6.1.1 Izbira središča ploskve

Splošni postopek za naključno izbiro mesta ploskve obsega sledeče korake (Slika 3):

- naključna izbira točke (zelena pika na Sliki 3a) na zemljevidu na gozdni cesti ali poti, ki poteka ob sestoju,
- risanje pravokotnice iz naključno izbrane točke na cesti,
- naključna izbira točke na črti (rdeča pika na Sliki 3b) – ta točka je središče ploskve za gozdni genetski monitoring.

Najmanjša razdalja med izbrano središčno točko in mejo sestoja mora biti vsaj 150 metrov. Če izbrana središčna točka ne ustreza tej zahtevi, je treba izbrati novo točko ob upoštevanju protokola, opisanega zgoraj.



Slika 3: Naključna izbira središča ploskve za gozdni genetski monitoring (a); izbira dreves okoli predhodno izbranega osrednjega drevesa v koncentričnih krogih s polmeri, ki se povečujejo za 30 metrov (b).

Namesto postopka, opisanega zgoraj, lahko uporabimo tudi orodja za ustvarjanje naključnih točk v programski opremi GIS.

Koordinate izbrane točke shranimo v napravi GPS, ki se bo uporabljala na terenu.

6.1.2 Postavitev ploskve na terenu

Razmnoževalno aktivno drevo, ki je na terenu najbližje shranjenim koordinatam GPS, postane središče ploskve za monitoring in se označi s številko 1.

Druga drevesa se izberejo okoli osrednjega drevesa v koncentričnih krogih s polmeri, ki se povečujejo za 30 metrov (Slika 3b). Prvo drevo v vsakem od krogov se izbere naključno, to pa se lahko naredi na različne načine: z naključnim azimutom (Preglednica 1), določenim od osrednjega drevesa, s pomočjo smeri sekundnega kazalca na analogni uri ali s katerim koli drugim pristopom, ki omogoča nepristransko izbiro. Preostala drevesa v vsakem od krogov izberemo z ustreznim povečanjem azimuta, da zagotovimo najmanjšo razdaljo 30 metrov med katerima koli drevesoma:

- +60° za prvi krog,
- +30° za drugi krog,
- +20° za tretji krog,
- +15° za četrti krog.

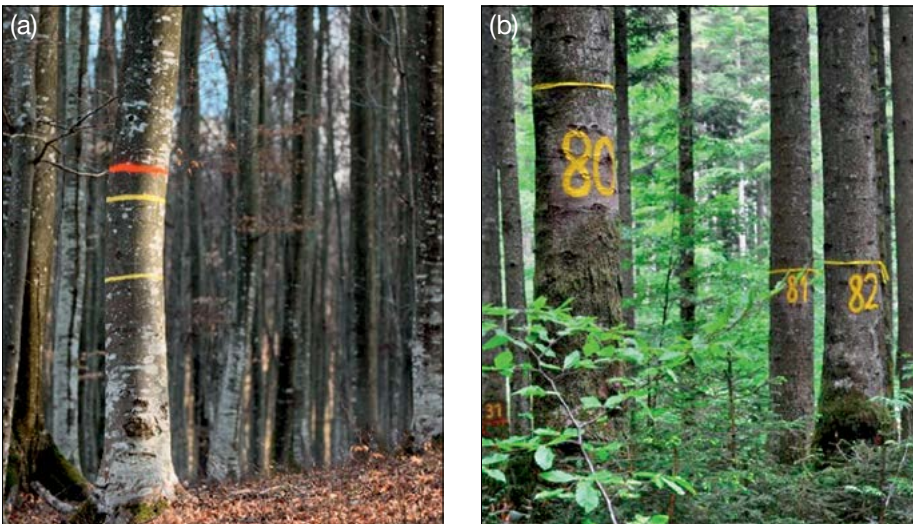
Če v notranjih treh krogih (Slika 3b) ni mogoče najti šestih, dvanajstih in osemnajstih dreves, izberemo dodatna drevesa v zunanem krogu. Zabeležiti moramo tudi koordinate vsakega drevesa (potrebujemo GPS).

Preglednica 1: Naključno določeni azimuti, ki jih lahko uporabimo za izbiro prvega drevesa v vsakem od krogov.

108	15	186	35	178	29	305	351	44	150
232	23	160	141	112	292	216	83	245	214
63	65	345	234	95	78	279	323	40	236
201	313	275	144	182	68	268	289	185	92
356	177	93	1	145	198	287	251	224	142

6.1.3 Označevanje dreves

Vsako izbrano drevo moramo označiti z ustrežno številko in barvno črto okoli debla za večjo vidnost dreves iz vseh smeri. Osrednje drevo (številka 1) označimo z dvema ali več črtami, da se bo razlikovalo od drugih dreves (Slika 4a). Številko je priporočljivo označiti na tisti strani drevesa, ki gleda stran od osrednjega drevesa, saj tako lažje najdemo osrednje drevo, zlasti če stojimo ob zunanjih krogih ploskve (Slika 4b).



Slika 4: a) osrednje drevo na ploskvi za gozdni genetski monitoring (GGM) je označeno z več črtami, da se razlikuje od drugih dreves (primer ploskve za GGM navadne bukve); b) številke so označene na izbranih drevesih tako, da gledajo stran od osrednjega drevesa. Na sliki je ploskev za GGM bele jelke (*Abies alba* Mill.) na Bavarskem.

6.2 Vzpostavitev podploskev za monitoring mladja

Vzpostavitev podploskev z mladjem se opravi v času kalitve po močnem ali masivnem obrodu.

Naravna pomladitvena jedra iz zadnjega semenskega leta na terenu popišemo in zabeležimo njihove lokacije (koordinate GPS, številka drevesa, ki je najbližje pomladitvenemu jedru). Med vsemi popisanimi pomladitvenimi jedri jih naključno izberemo 20 za vzpostavitev podploskev. Če je pomladitvenih jeder 20 ali manj, uporabimo vsa.

Znotraj vsakega izbranega pomladitvenega jedra postavimo podploskev za monitoring mladja s površino 1 m², ki jo označimo s kovinskimi palicami. Palice na vsakem oglišču podploskve zapičimo v tla, kolikor je mogoče globoko, da jih ne bi odstranile živali. Vrhove palic za boljšo vidnost pobarvamo.

6.3 Vzdrževanje ploskve

6.3.1 Splošno vzdrževanje

Označbe dreves in podploskev za monitoring mladja redno (vsaki dve leti) pregledujemo in po potrebi popravimo.

6.3.2 Nadomeščanje dreves

Če opazovano drevo odmre ali se v okviru gospodarjenja poseka, ga moramo nadomestiti. Izberemo ustrezno drevo, ki je najbližje odmrlemu in izpolnjuje zahtevo po najmanjši oddaljenosti od najbližjega opazovanega drevesa 30 m. Če to ni mogoče, izberemo drevo z obrobja (najbolje na zunanem krogu) ploskve. Nadomestno drevo se označi z naslednjo prosto številko, višjo od 50, tj. 51, 52, 53 itd., da ga lahko jasno ločimo od prvotno izbranih 50 dreves.

Če ima drevo poškodovano krošnjo, na primer zaradi vetroloma, žledoloma ali snegoloma, a lahko še obrodi, ga v monitoringu obdržimo. Vzrok poškodbe je treba zabeležiti, saj lahko poškodba vpliva na ugotovljene vrednosti verifikatorjev in dodatnih informacij. Če je škoda prehuda in obrod ni več pričakovan, moramo opazovano drevo nadomestiti.

7 Popis verifikatorjev in dodatnih informacij

Verifikatorje in dodatne informacije na ploskvi za monitoring redno popisujemo. Z verifikatorji spremljamo genetske lastnosti populacije ter njeno prilagajanje okoljskim spremembam in/ali gospodarjenju, dodatne informacije pa popisujemo za lažje tolmačenje verifikatorjev.

Pri popisu verifikatorjev na višjih ravneh (standardna, napredna) moramo popisati tudi podatke za nižje ravni (osnovna, standardna). Pri popisu dodatnih informacij to ni potrebno.

Preglednica 2: Seznam verifikatorjev in dodatnih informacij s kratkim opisom in pogostostjo opazovanja za terensko popisovanje na ploskvah za genetski monitoring črnega bora.

Ime	Osnovna raven	Standardna raven	Napredna raven	
Mortaliteta/ preživetje	Odrasla drevesa: štetje preostalih označenih dreves vsakih 10 let in po vsakem ekstremnem vremenskem pojavu/motnji	Enaka kot osnovna raven	Enaka kot osnovna raven	
	Mladje: /	Štetje preostalega mladja na podploskvah za monitoring mladja, dvakrat na desetletje	Enaka kot standardna raven	
Verifikatorji	Cvetenje	Opazovanje na ravni posameznih dreves ob dveh obilnih cvetenjih na desetletje, najbolje v enakomernih časovnih razmikih*	Kot standardna raven, vendar se dodatno opiše tudi faza razvoja ženskih in moških cvetov*	
	Obrod	Opazovanje na ravni posameznih dreves, v istem letu kot ocena cvetenja na standardni ravni (ne glede na jakost obroda)*	Štetje plodov, v istem letu kot ocena cvetenja na napredni ravni, ne glede na jakost obroda* Za vsak ocenjeni obrod naberemo tudi semena za laboratorijske analize	
	Obilnost mladja	Ocena na ravni sestoja, vsako leto	Štetje mladja ustrezne starosti na podploskvah z mladjem v 1. in nato v 6. letu po vsakem ocenjenem obrodu	Štetje mladja ustrezne starosti na podploskvah z mladjem 1. in nato v 6., 11. in 16. letu po vsakem ocenjenem obrodu
Dodatne informacije	Porazdelitev debelinskih razredov	/	Meritev vsakih 10 let	Enaka kot standardna raven
	Porazdelitev višinskih razredov	/	Meritev vsakih 10 let	Enaka kot standardna raven
	Olistanje	/	Opazovanje na ravni posameznih dreves, vsakih 5 let	Opazovanje na ravni posameznih dreves, vsako leto
	Senescenca	/	Opazovanje na ravni posameznih dreves, vsakih 5 let	Opazovanje na ravni posameznih dreves, vsako leto
Usklajenost cvetenja	/	/	Opazovanje na ravni posameznih dreves, ob vsakem ocenjenem obilnem cvetenju	

* Najbolje je, da vsako desetletje ocenimo vsaj en obilen obrod. Vendar pa vsakemu obilnemu cvetenju ne sledi nujno obilen obrod. Če ocenjenemu cvetenju ne sledi obilen obrod, moramo oceno cvetenja in obroda ponoviti ob naslednjem obilnem cvetenju, ne glede na to, koliko časa preteče med zaporednima obilnima cvetenjema. Obilno cvetenje in obrod prepoznamo z opazovanjem na osnovni ravni.

7.1 Protokoli za popis verifikatorjev

7.1.1 Mortalitet/preživetje

Mortaliteta opisuje mortaliteto odraslih dreves in naravnega mladja. Nasprotni pojem, preživetje, pomeni drevesa, ki so od zadnje ocene še živa. Oba parametra se izražata v relativnih enotah, tj. deležu odmrlih oziroma preživelih dreves. Preživetje izračunamo s formulo $1 - \text{mortaliteta}$ (izražena kot delež odmrlih dreves).

7.1.1.1 Odrasla drevesa: osnovna, standardna in napredna raven

Verifikator mortaliteta odraslih dreves ocenimo tako, da preštejemo preostala živa označena drevesa vsakih 10 let in po vsakem ekstremnem vremenskem pojavu/motnji. Mortalitet je razlika med začetnim številom označenih dreves in številom še živih dreves izmed prvotnih 50.

7.1.1.2 Mladje: standardna in napredna raven

Mortaliteto mladja izračunamo iz ocen verifikatorja Obilnost mladja (razdelek 7.1.4). Mortalitet je razlika med začetnim številom mladja in številom še živega mladja ob naslednjem štetju. Za vsako ocenjevanje obilnosti mladje najprej preštejemo v letu kalitve in nato 5 let kasneje na standardni ravni, na napredni ravni pa še 10 in 15 let kasneje. Na standardni ravni za vsako ocenjevanje izračunamo mortaliteto po petih letih, na napredni ravni pa še po 10 in 15 letih. Obilnost mladja se ocenjuje dvakrat na desetletje, najbolje približno vsakih pet let.

7.1.2 Cvetenje

Ta verifikator opisuje jakost cvetenja in delež dreves, ki cvetijo. Običajno ga lahko popišemo od konca aprila do začetka junija.

7.1.2.1 Osnovna raven

Ta verifikator popišemo vsako leto na ravni sestoja. Popis opravimo, ko je cvetenje v polnem zamahu. Povprečno stanje ocenimo po pregledu celotne ploskve za monitoring. Zabeležimo dva rezultata, enega za jakost cvetenja, izraženo kot povprečni delež krošnje s cvetovi, in drugega za delež cvetočih dreves v sestoji.

Šifra	Jakost cvetenja na ravni sestoja	Povprečni delež krošnje s cvetovi (%)
1	Brez cvetenja: na drevesih ni cvetov ali so cvetovi le ponekod.	0–10
2	Šibko cvetenje: na drevesih je nekaj cvetov.	> 10–30
3	Zmerno cvetenje: na drevesih je zmerno število cvetov.	> 30–60
4	Močno cvetenje: na drevesih je veliko število cvetov.	> 60–90
5	Masivno cvetenje: na drevesih je ogromno število cvetov.	> 90

Šifra	Delež dreves v sestoji z navedeno jakostjo cvetenja (%)
1	0–10
2	> 10–30
3	> 30–60
4	> 60–90
5	> 90

7.1.2.2 Standardna raven

Ta verifikator popišemo ob dveh obilnih cvetenjih na desetletje, najbolje v enakomernih časovnih razmikih. Popišemo ga na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves. Cvetenje je obilno, ko je na osnovni ravni ocenjeno kot močno ali masivno (šifra 4 ali 5) in je delež dreves z navedeno jakostjo cvetenja večji od 60 % (šifra 4 ali 5). Popis opravimo, ko je cvetenje v polnem zamahu. Za vsako drevo navedemo en rezultat.

Šifra	Jakost cvetenja	Delež krošnje s cvetovi (%)
1	Brez cvetenja: na drevesu ni cvetov ali so cvetovi le ponekod.	0–10
2	Šibko cvetenje: na drevesu je nekaj cvetov.	> 10–30
3	Zmerno cvetenje: na drevesu je zmerno število cvetov.	> 30–60
4	Močno cvetenje: na drevesu je veliko število cvetov.	> 60–90
5	Masivno cvetenje: na drevesu je ogromno število cvetov.	> 90

7.1.2.3 Napredna raven

Ta verifikator popišemo ob dveh obilnih cvetenjih na desetletje, najbolje v enakomernih časovnih razmikih. Popišemo ga na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves. Cvetenje je obilno, ko je na osnovni ravni ocenjeno kot močno ali masivno (šifra 4 ali 5) in je delež dreves z navedeno jakostjo cvetenja večji od 60 % (šifra 4 ali 5). Povprečno sta potrebna dva obiska ploskve; prvi dovolj zgodaj, da opazujemo zgodnje faze cvetenja, in drugi, ko je cvetenje v polnem razmahu.

Za vsako drevo navedemo tri rezultate: fazi ženskega in moškega cvetenja [5] ter delež krošnje s cvetovi. Delež krošnje s cvetovi se nanaša na skupno število cvetov (moški + ženski) na drevesu. Faze cvetenja prikazuje Slika 5.

Vsakemu obilnemu cvetenju ne sledi nujno obilen obrod. Če ocenjenemu cvetenju ne sledi obilen obrod, moramo oceno cvetenja in obroda ponoviti ob naslednjem obilnem cvetenju. Obilno cvetenje in obrod prepoznamo z opazovanjem na osnovni ravni.

Šifra	Fenološke faze ženskih cvetov
1	Ženski cvetni brsti so na vrhu poganjka jasno vidni, vendar je ženski storžek popolnoma prekrit z luskami.
2	Vrh valjastega storžka se odpre in pojavijo se prve plodne luske.
3	Luske ženskega storžka so odmaknjene in skoraj pravokotne na os storžka (receptivnost 100 %).
4	Luske storžka so zaprte.

Šifra	Fenološke faze moških cvetov
1	Moški strobili se razvijajo, vendar so še zaprti v integumentih.
2	Mikrosporangiji niso tesno skupaj, iz strobilov se ob pritisku izloča zelena do rumena tekočina.
3	Rumeni strobili trosijo pelod.

Šifra	Delež krošnje s cvetovi (%; moško in žensko cvetenje skupaj)
1	0–10
2	> 10–30
3	> 30–60
4	> 60–90
5	> 90

Dodatno informacijo Usklajenost cvetenja lahko ocenimo na podlagi rezultatov za žensko in moško cvetenje, ki jih dobimo za ta verifikator.

Slika 5: Slikovni vodnik za opisovanje faz ženskih cvetov (a) in moških cvetov (b) dreves črnega bora na napredni ravni verifikatorja Cvetenje.

(a)

1



2



3



4



(b)

1



2



3



7.1.3 Obrod

Ta verifikator opisuje prisotnost obroda in njegovo obilnost. Podatke za ta verifikator zbiramo v času obroda in ko so storži zreli, v srednji Evropi od septembra do novembra. Pomembno je omeniti, da pri tej vrsti storži dozorijo drugo jesen po cvetenju.

7.1.3.1 Osnovna raven

Ta verifikator popišemo vsako leto na ravni sestoja. Povprečno stanje ocenimo po pregledu celotne ploskve za monitoring. Zabeležimo dva rezultata, enega za jakost obroda in drugega za delež dreves v sestoji, ki so obrodila.

Šifra	Jakost obroda na ravni sestoja	Povprečni delež krošnje s plodovi (%)
1	Brez obroda: na drevesih ni storžev ali so storži le ponekod.	0–10
2	Šibek obrod: na drevesih je nekaj storžev.	> 10–30
3	Zmeren obrod: na drevesih je zmerno število storžev.	> 30–60
4	Močen obrod: na drevesih je veliko število storžev.	> 60–90
5	Masiven obrod: na drevesih je ogromno število storžev.	> 90

Šifra	Delež dreves v sestoji z navedeno jakostjo obroda (%)
1	0–10
2	> 10–30
3	> 30–60
4	> 60–90
5	> 90

7.1.3.2 Standardna raven

Ta verifikator popišemo drugo jesen (od septembra do novembra) po oceni cvetenja na standardni ravni (ne glede na jakost obroda). Popišemo ga na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves. Popis opravimo, preden zreli storži sprostijo seme in začnejo odpadati. Za vsako drevo navedemo en rezultat.

Najbolje je, da po opaženih obilnih cvetenjih zajamemo vsaj en obilen obrod na desetletje. Vendar pa vsakemu obilnemu cvetenju ne sledi nujno obilen obrod. Če ocenjenemu cvetenju ne sledi obilen obrod, moramo oceno cvetenja in obroda ponoviti ob naslednjem obilnem cvetenju in obrodu, ne glede na to, koliko časa preteče med zaporednima obilnima cvetenjema. Obilen obrod prepoznamo z opazovanjem na osnovni ravni. Obrod je obilen, ko je na osnovni ravni ocenjen kot močen ali masiven (šifra 4 ali 5) in je delež dreves z navedeno stopnjo jakosti obroda večji od 60 % (šifra 4 ali 5).

Šifra	Jakost obroda	Delež krošnje s plodovi (%)
1	Brez obroda: na drevesu ni plodov ali so plodovi le ponekod.	0–10
2	Šibek obrod: na drevesu je nekaj plodov.	> 10–30
3	Zmeren obrod: na drevesu je zmerna količina plodov.	> 30–60
4	Močen obrod: na drevesu je veliko plodov.	> 60–90
5	Masiven obrod: na drevesu je ogromno plodov.	> 90

7.1.3.3 Napredna raven

Ta verifikator popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves dve leti (drugo jesen) po oceni cvetenja na napredni ravni, ne glede na jakost obroda. Popis opravimo, preden se storži odprejo in sprostijo seme. Za vsako drevo navedemo en rezultat in zabeležimo kateri del krošnje smo opazovali. Obenem nabereмо seme za testiranje semena in genetsko analizo za verifikatorje in dodatne informacije na napredni ravni.

Najbolje je, da po opaženih obilnih cvetenjih zajamemo vsaj en obilen obrod na desetletje. Vendar pa vsakemu obilnemu cvetenju ne sledi nujno obilen obrod. Če ocenjenemu cvetenju čez dve leti ne sledi obilen obrod, moramo oceno cvetenja in obroda ponoviti ob naslednjem obilnem cvetenju, ne glede na to, koliko časa preteče med zaporednima obilnima cvetenjema. Obilen obrod prepoznamo z opazovanjem na osnovni ravni. Obrod je

obiln, ko je na osnovni ravni ocenjen kot močen ali masiven (šifra 4 ali 5) in je delež dreves z navedeno stopnjo jakosti obroda večji od 60 % (šifra 4 ali 5).

Verifikator popišemo tako, da skozi daljnogled preštejemo storže. Uporabimo povprečni rezultat treh zaporednih štetij. Rezultat vsakega štetja je število storžev, ki jih opazovalec prešteje v 30 sekundah. Ko štejemo storže, moramo pri vseh drevesih opazovati isti del krošnje. Ko izberemo del krošnje, ki ga bomo opazovali, moramo ob vsakem naslednjem spremljanju tega verifikatorja izbrati isti del krošnje. Zgornja tretjina krošnje je za štetje storžev ustrežnejša od spodnjega in srednjega dela.

Zabeležimo dve vrednosti, število plodov in opazovani del krošnje.

Število storžev, prešteti v 30 sekundah (povprečje 3 štetij)

X

Šifra Opazovani del krošnje

1 Spodnji

2 Srednji

3 Zgornji

6.1.4 Obilnost mladja

Ta verifikator opisuje prisotnost in obilnost mladja na ploskvi.

7.1.4.1 Osnovna raven

Ta verifikator popišemo na ravni sestoja, jeseni vsako leto. Za oceno uporabimo strokovno mnenje glede na stanje na celotni ploskvi. Zabeležimo dve vrednosti, eno za novo naravno mladje (mladje, ki je vzkalilo v istem letu kot se opravlja opazovanje) in eno za starejše mladje (mladje, ki je starejše od enega leta). Polni obrod (semensko leto) je pri črnem boru običajno na od 3 do 5 let, zato moramo rast novega naravnega mladja oceniti poleti/jeseni v letu, ki sledi semenskemu.

Šifra Opis: novo mladje (mladje starosti do enega leta)

1a Na ploskvi ni novega mladja ali ga je zelo malo.

2a Na ploskvi je zadostna količina novega mladja.

Šifra Opis: starejše naravno mladje (mladje starejše od enega leta)

1b Na ploskvi ni starejšega mladja ali ga je zelo malo.

2b Na ploskvi je zadostna količina starejšega mladja.

7.1.4.2 Standardna raven

Ta verifikator popišemo tako, da preštejemo rastline/mladje starosti do enega leta 1. jesen po vsakem ocenjenem obrodu (leto obroda štejejo kot leto 0) in 6. jesen po obrodu (takrat štejejo 5 let staro mladje).

Štetje mladja:

Po vzpostavitvi podploskev za monitoring mladja moramo prešteti vse mladike črnega bora starosti do enega leta na vsaki izmed 20 podploskev. Starejšega borovega mladja na podploskvah ne štejejo. Pri naslednjem štetju štejejo samo mladje ustrezne starosti, npr. v 6. letu štejejo 5-letno mladje.

Rezultat štetja mladja na podploskvi

X

Mortaliteto/preživetje mladja izračunamo iz vrednosti, zabeleženih za ta verifikator.

Vzpostavitev podploskev je opisana v razdelku 6.2, Vzpostavitev podploskev za monitoring mladja.

7.1.4.3 Napredna raven

Ta verifikator popišemo tako, da na vsaki od 20 podploskev za monitoring mladja preštejemo mladje 1. jesen po obilnem obrodu (leto obroda štejejo kot leto 0) ter nato 6., 11. in 16. jesen po tem obrodu. Pri vsakem štetju štejejo samo mladje ustrezne starosti: 1. jesen mladje starosti do enega leta, 6. jesen 5-letno mladje, 11. jesen 10-letno mladje itn. Naslednji krog monitoringa obilnosti mladja (vzpostavitev novih 20 podploskev za monitoring mladja in ocenjevanje njegove obilnosti) izvedemo vsaj 5 let po prejšnjem obilnem obrodu (časovni potek ocenjevanja obilnosti mladja prikazuje Preglednica 3). Za vsako obdobje monitoringa se pričakuje ocena obilnosti naravnega mladja po enem ali dveh obilnih obrodih.

Preglednica 3: Časovni potek ocenjevanja obilnosti mladja. V spodnjem primeru se prvi obilen obrod zgodi v drugem letu monitoringa, drugi ocenjeni obrod pa pet let pozneje, tj. v 7. letu monitoringa. Ker se pri črnem boru obilen obrod zgodi na 3–5 let, se lahko časovni razmik med dvema zaporednima obilnima obrodoma ustrezno razlikuje. Po vsakem ocenjenem obrodu se vzpostavi novih dvajset podploskev z mladjem. Monitoring obilnosti mladja se za vsako skupino 20 podploskev opravi vsakih pet let. Obrodi, iz katerih je zrastle ocenjevano mladje, in časovni potek ocenjevalnih dejavnosti so obarvani z enako barvo. Po zadnjem štetju mladja se monitoring obilnosti mladja na ustrezni skupini podploskev ustavi in podploskve se ukinejo. S – standardna raven; N – napredna raven.

Leto monitoringa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
Obrod		•					•							•						•				
Ocena mladja za 1. ocenjeni obrod [leta]		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
Vzpostavitev podploskev z mladjem			SN																					
Štetje obilnosti mladja			SN				SN					N					N							
Ocena mladja za 2. ocenjeni obrod [leta]								0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Vzpostavitev podploskev z mladjem									SN															
Štetje obilnosti mladja									SN				SN					N						N

Mortaliteto/preživetje mladja izračunamo iz vrednosti, zabeleženih za ta verifikator.

Vzpostavitev podploskev je opisana v razdelku 6.2, Vzpostavitev podploskev za monitoring mladja, štetje pa v razdelku 7.1.4.2, Standardna raven.

7.1 Protokoli za popis dodatnih informacij

7.2.1 Porazdelitev debelinskih razredov

7.2.1.1 Standardna in napredna raven

Prsni premer popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves vsakih 10 let. Prsni premer je premer debla na višini 1,30 m, tj. približno v višini prsi odraslega človeka. Če ima drevo več kot eno deblo, izmerimo vsa in ocenimo povprečno vrednost (izogniti se skušamo drevesom s številnimi tankimi debli). V opombe zapišemo, da je drevo večdebelno. Če je drevo nagnjeno, prsni premer izmerimo pravokotno na deblo. Prsni premer lahko izmerimo na dva načina:

- 1) s premerko, v tem primeru izmerimo dva premera, pravokotno eden na drugega, in izračunamo povprečje;
- 2) z meritvijo obsega drevesa, iz katerega izračunamo premer (delimo ga s številom π , $\sim 3,14$, ali uporabimo pi-meter).

Prsni premer zapisujemo v cm. Pri vsakem naslednjem merjenju moramo uporabiti isto merilno metodo.

7.2.2 Porazdelitev višinskih razredov

7.2.2.1 Standardna in napredna raven

Višino popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves vsakih 10 let. Višino izmerimo od tal do najvišjega dela krošnje, najbolje s klinometrom ali višinomerom (npr. Vertex). Višino beležimo v metrih na eno decimalno mesto natančno. Če je krošnja poškodovana, moramo v opombe zabeležiti tudi to, skupaj z razlogom poškodbe.

6.1.3 Olistanje

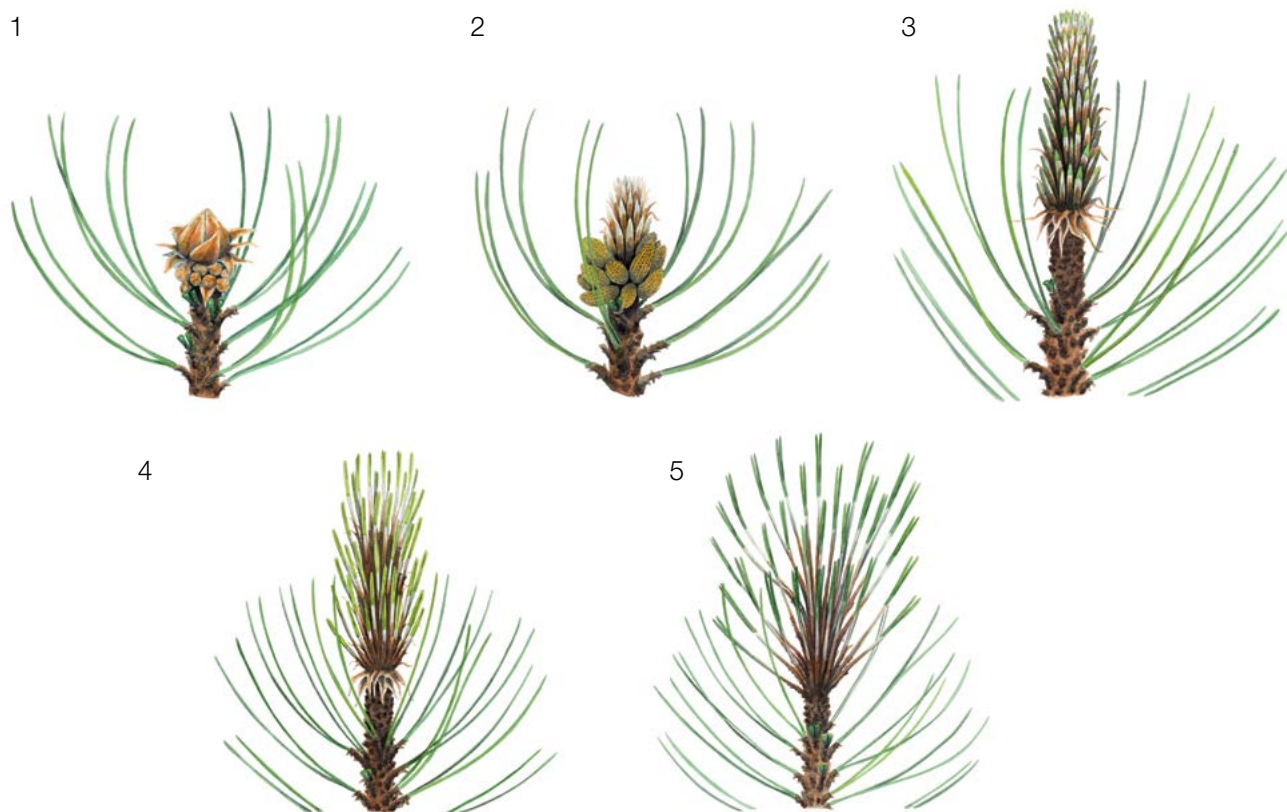
Olistanje opisuje razvoj mladih iglic. Pri črnem boru se začne nekoliko pozneje kot cvetenje. Popis te dodatne informacije opravimo samo na standardni in napredni ravni. Podatke za olistanje zbiramo aprila in maja, do takrat, ko imajo vsa opazovana drevesa polno razvite iglice.

7.2.3.1 Standardna raven

Na standardni ravni olistanje popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves vsakih 5 let. Zanimata nas začetek (2. faza) in konec olistanja (5. faza). Opazovanje se preneha, ko vsa drevesa dosežejo 5. fazo. Običajno je potrebnih šest obiskov. Za vsako drevo zabeležimo dve oceni: faza olistanja in delež krošnje z razvijajočimi se iglicami. Faze olistanja prikazuje slika 6.

Šifra	Faza olistanja (poenostavljene faze po [5])
1	Speči brsti
2	Začetek dolžinske rasti
3	Znatna dolžinska rast terminalnega brsta
4	Iz prosojnih ovojníc pogledajo iglice
5	Jasno razločni dve iglici na posameznem brahiblastu

Šifra	Delež krošnje z navedeno fazo olistanja (%)
1	> 0–33
2	> 33–66
3	> 66–99
4	100



Slika 6: Slikovni vodnik za opisovanje olistanja (razvoja iglic) na osnovni, standardni in napredni ravni za dodatno informacijo Olistanje.

7.2.3.2 Napredna raven

Na napredni ravni olistanje popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves, vsako leto. Vrednosti, ki ustrezajo posameznim fazam olistanja, so navedene v razdelku 7.2.3.1.

6.1.4 Usklajenost cvetenja

7.2.4.1 Napredna raven

Usklajenost cvetenja spremljamo samo na napredni ravni na podlagi podatkov, zbranih za verifikator Cvetenje na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves ob vsakem ocenjenem obilnem cvetenju. S to informacijo ugotavljamo, ali sta moško in žensko cvetenje pri drevesih na ploskvi za monitoring časovno usklajeni [15].

Za vzpostavitev ploskve uporabite obrazec: »GGM - Opis ploskve«

Za popis verifikatorjev uporabite obrazec: »GGM - Terenski verifikatorji«

Za popis dodatnih informacij uporabite obrazec: »GGM - Terenske dodatne informacije«

8. Viri

1. Farjon A (2017) A Handbook of the World's Conifers. 2nd revised Edition, Volume 1. Brill Leiden - Boston. Brill Acad. Publ. <https://doi.org/10.1163/9789047430629>
2. Burns RM, Honkala BH (1990) Silvics of North America. Volume 1. Conifers. Agriculture Handbook 654, USDA Forest service, Washington
3. Vidaković M (1958) Investigation on the intermediate type between the Austrian and Scots pine. *Silv Gen* 7:12–19.
4. Fukarek P (1958) Die Standortstrassen per Schwarzföhre (*Pinus nigra* Arn.). *Centralblatt fuer das gesamte Forstwesen* 75:203–207
5. McWilliam JR (1959) Interspecific incompatibility in *Pinus*. *Am J Bot* 46:425–433. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1959.tb07033.x>
6. Righter FI, Duffield JW (1951) Interspecific hybrids in pines. *J Hered* 42:75–80. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a106169>
7. Juranović-Cindrić I, Zeiner M, Starčević A, Liber Z, Rusak G, Idžojtić M, Stingeder G (2018) Influence of F1 hybridization on the metal uptake behaviour of pine trees (*Pinus nigra* x *Pinus thunbergiana*; *Pinus thunbergiana* x *Pinus nigra*). *J. Trace Elem Med Biol* 48:190–195. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.04.009>
8. Vidaković M (1974) Genetics of European black pine (*Pinus nigra* Arn.). *Annales Forestales* (6/3):57–86.
9. Mitchell AF (1972) Conifers in the British Isles: A descriptive handbook. Forestry Commission Booklet No. 33. London: Her Majesty's Stationery Office
10. Rose CI (1979) Observations on the ecology and conservation value of native and introduced tree species. *Q J Forest* 73(4):219–229
11. Athanasiadis NH (1986) Forest Botany (Trees and Shrubs of the Hellenic Forests). Part II. Publ. Giahoudi Thessaloniki
12. Isajev V, Fady B, Semerci H, Andonovski V (2004) EUFORGEN technical guidelines for genetic conservation and use of European black pine (*Pinus nigra*). International Plant Genetic Resources Institute, Rome
13. Van Haverbeke DF (1990) *Pinus nigra* Arnold - European black pine. In: Burns RM; Honkala BH (eds). *Silvics of North America. Volume 1. Conifers. Agric. Handb. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Washington, DC*
14. Freeland RO (1944) Apparent photosynthesis in some conifers during the winter. *Pl Physiol* 19:179–185
15. Boutheina A, El Aouni MH, Balandier P (2013) Influence of stand and tree attributes and silviculture on cone and seed productions in forests of *Pinus pinea* L. in northern Tunisia. *Options Méditerranéennes Series A: Mediterranean Seminars*, No. 105. CIHEAM, FAO, INIA, IRTA, CESEFOR, CTFC, Zaragoza
16. Nicholls TH, Hudler GW (1971) *Dothistroma pini* on *Pinus nigra* in Minnesota. *Plant Disease Reporter* 55: 1040.
17. Millar CS (1970) Role of *Lophodermella* species in premature death of Pine needles in Scotland. Report on Forest Research, London, pp 176-178
18. Blodgett JT, Eyles A, Bonello P (2007) Organ-dependent induction of systemic resistance and systemic susceptibility in *Pinus nigra* inoculated with *Sphaeropsis sapinea* and *Diplodia scrobiculata*. *Tree Physiol* 27: 511–517. <https://doi.org/10.1093/treephys/27.4.511>
19. Alizoti PG, Kilimis K, Gallios P (2010). Temporal and spatial variation of flowering among *Pinus nigra* Arn. clones under changing climatic conditions. *For Ecol Manag* 259:768–797. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foreco.2009.06.029>

Za veljavno znanstveno nomenklaturu vrst so bili uporabljeni sledeči viri:

- a. Avtzis N (1985) *Marchalina hellenica* (*Monophlebus hellenicus*) Gen. An important honey producing insect of Greece. *Dasiki Erevna* VI(1):51-63
- b. Bußkamp J, Langer GJ & Langer EJ (2020) *Sphaeropsis sapinea* and fungal endophyte diversity in twigs of Scots pine (*Pinus sylvestris*) in Germany. *Mycol Progress* 19:985–999. <https://doi.org/10.1007/s11557-020-01617-0>
- c. CABI (2020) Invasive Species Compendium. CAB International, Wallingford, UK. www.cabi.org/isc. Pridobljeno 15 december 2020
- d. EPPO (2020) EPPO Global Database (available online). <https://gd.eppo.int>. Pridobljeno 15 december 2020
- e. GBIF (2020) Global Biodiversity Information Facility. <https://www.gbif.org> Pridobljeno 15 december 2020
- f. IPNI (2020) International Plant Names Index. The Royal Botanic Gardens, Kew, Harvard University Herbaria & Libraries & Australian National Botanic Gardens. <http://www.ipni.org>, Pridobljeno 10 december 2020
- g. National Center for Biotechnology Information (NCBI) (1998) National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, Bethesda (MD). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Pridobljeno 15 december 2020
- h. The Plant List (2013) Version 1.1. <http://www.theplantlist.org/>. Pridobljeno 12 december 2020
- i. Tropicos.org (2020) Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org>. Pridobljeno 15 december 2020
- j. WFO (2020) World Flora Online. <http://www.worldfloraonline.org>. Pridobljeno 15 december 2020

Smernice za gozdni genetski monitoring

9.2.5 evropskega črnega topola (*Populus nigra* L.)

Gregor BOŽIČ¹, Sándor BORDÁCS², Berthold HEINZE³, Marko BAJC¹,
Filippos A. ARAVANOPOULOS⁴, Dalibor BALLIAN^{1,5}, Rok DAMJANIČ¹,
Barbara FUSSI⁶, Darius KAVALIAUSKAS⁶, Zvonimir VUJNOVIČ⁷,
Marjana WESTERGREN¹, Hojka KRAIGHER¹

Ilustracije: Marina Gabor



Navedba: Božič in sod. (2020) Smernice za gozdni genetski monitoring evropskega črnega topola (*Populus nigra* L.). V: Bajc in sod. (ur.) Priročnik za gozdni genetski monitoring. Gozdarski inštitut Slovenije: Založba Silva Slovenica, Ljubljana, str. 235-254. <http://dx.doi.org/10.20315/SFS.168>

Povezane ustanove:

1. Gozdarski inštitut Slovenije (GIS), Slovenija
2. Univerza Szent István (SZIE), Madžarska
3. Zvezni center za raziskave in usposabljanje na področju gozdov, naravnih nesreč in pokrajine (BFW), Avstrija
4. Aristotelova univerza v Solunu (AUTh), Grčija
5. Univerza v Sarajevu, Fakulteta za gozdarstvo, Bosna in Hercegovina
6. Bavarski urad za gozdno genetiko (AWG), Nemčija
7. Hrvaški gozdarski inštitut (CFRI), Hrvaška

1 Povzetek

Evropski črni topol je ekološko pomembna hitro rastoča in kratkoživa listopadna gozdna drevesna vrsta mešanih aluvialnih gozdov s fiziološko prilagoditvijo za naselitev in preživetje na golih površinah, ki nastanejo po motnjah povezanih z dinamiko rečnih sistemov. Omogoča zadrževanje vode v ekosistemu pri poplavljanju, je ključna vrsta za dinamično ohranjanje in obnavljanje habitata poplavnih gozdov ter velja za indikatorsko vrsto za zdravje in biotsko raznovrstnost obrežnih ekosistemov [1]. Evropski črni topol je znan tudi po tem, da lahko hitro raste ter iz tal vsrka velike količine vode in hranil. Zaradi te sposobnosti je pomemben za fitoremediacijo in revitalizacijo degradiranih površin in onesnaženih industrijskih območjih, za uravnavanje mikroklimе ter za izboljšanje biotske raznovrstnosti tudi na zunajgozdnih površinah [2]. Uporablja se kot starševsko drevo v številnih programih žlahtnenja topola po vsem svetu. Ima sposobnost odganja iz panja, zato je primeren za dolgoročno ohranjanje najboljših genotipov vrstno čistega rastlinskega materiala evropskega črnega topola v zbirkah *ex situ*. V okviru programa EUFORGEN [3] so predlagali številna priporočila za vzpostavitev enot ohranjanja *in situ* in metod ohranjanja *ex situ*, ki so jih pozneje uporabili v številnih regionalnih projektih [4].

Evropski črni topol naravno oblikuje metapopulacije medsebojno povezanih lokalnih populacij in ne majhnih izoliranih populacij [6]. Če želimo zagotoviti reprezentativno vzorčenje v metapopulaciji, moram v sistem za genetski monitoring vključevati naključno izbrane ploskve za monitoring odraslih dreves v lokalnih populacijah in ploskve za monitoring v njihovih pomladitvenih jedrih ob rečnem sistemu kot sestavnem delu celotnega omrežja medsebojno povezanih lokalnih populacij. Genetsko identifikacijo dreves evropskega črnega topola je treba izvesti ob uporabi markerjev DNK za diagnostiko vrste. Glavna ovira za gozdni genetski monitoring evropskega črnega topola je odkrivanje habitatov, kjer se vrsta uspešno razmnožuje in ji okoljske razmere omogočajo dolgoročno preživetje potomcev.

Smernice na kratko opisujejo evropski črni topol, njegovo razmnoževanje, življenjsko okolje in nevarnosti ter vsebujejo napotke za vzpostavitev ploskve za gozdni genetski monitoring *in situ* ter popis vseh terenskih verifikatorjev in dodatnih informacij.

2 Opis vrste

Evropski črni topol (Slika 1) je domorodna svetloboljubna in listopadna gozdna drevesna vrsta, ki za rast potrebuje veliko hranil in naravno uspeva v zmernih pasovih Evrazije. Pripada sekciji *Aigeros* v rodu *Populus* v družini *Salicaceae* [5]. Evropski črni topol naseljuje gole površine, ki nastanejo po motnjah povezanih z dinamiko rečnih sistemov, najdemo pa ga v zgodnjih sukcesijskih fazah obrežnih mešanih gozdnih ekosistemov. Oblikuje različne vrste lokalnih populacij, od izoliranih posamičnih dreves, manjših skupin vse do večjih čistih ali mešanih sestojev. Evropski črni topol naravno oblikuje metapopulacije, sestavljene iz manjših lokalnih populacij [6, 7].

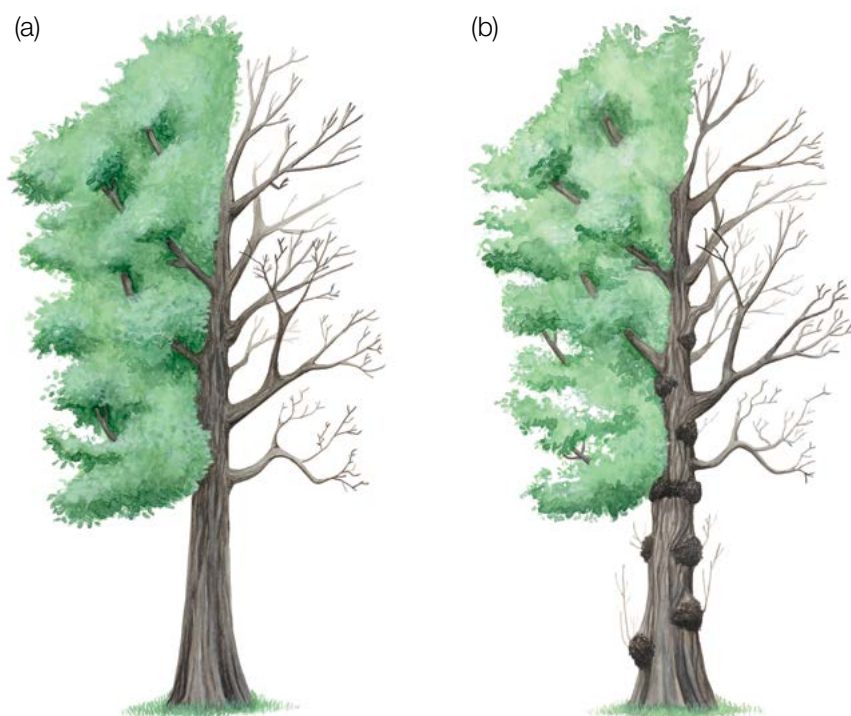
Evropski črni topol je srednje visoko do visoko drevo, običajno doseže višino do 40 metrov in ima premer debla do 300 centimetrov ter živi od 100 do 200 let. Poredkoma lahko posamezna drevesa dosežejo starost 400 let [8, 9]. Pogosto oblikuje nepravilno razporejeno košato krošnjo. Pogosto ima ukrivljeno ali zavito deblo s podpornimi koreninami, drevo je lahko masivno, pogosto se pojavljajo tudi velike grče ali epikormske veje. vendar so nekatera drevesa v sestojih lahko vzravnana in lepo raščena. [10]. Lubje odraslih dreves je temno rjavo ali črno (Slika 2a) s številnimi globokimi brazdami [11]. Listi imajo romboidno (diamantno) ali trikotno obliko, dolgi so od 5 do 12 centimetrov, široki od 4 do 10 centimetrov, pecelj je dolg od 2 do 6 centimetrov [12, 13], robovi listov so nazobčani in listi so zeleni na obeh straneh (Slika 2b). Drevesa dosežejo razmnoževalno zrelost v starosti od 10 do 15 let [14].

Morfološke in fenološke lastnosti vrste *Populus nigra* je mogoče uporabiti kot pristop za prvo raven prepoznavanja čistih (ne križancev oz. hibridnih) dreves evropskega črnega topola, vsaj pri odraslih osebkih. Najstabilnejše lastnosti in znaki, značilni za vrsto, so podrobno opisani v opisnem listu za identifikacijo vrste *Populus nigra*, pripravljenem v okviru programa EUFORGEN [24]:

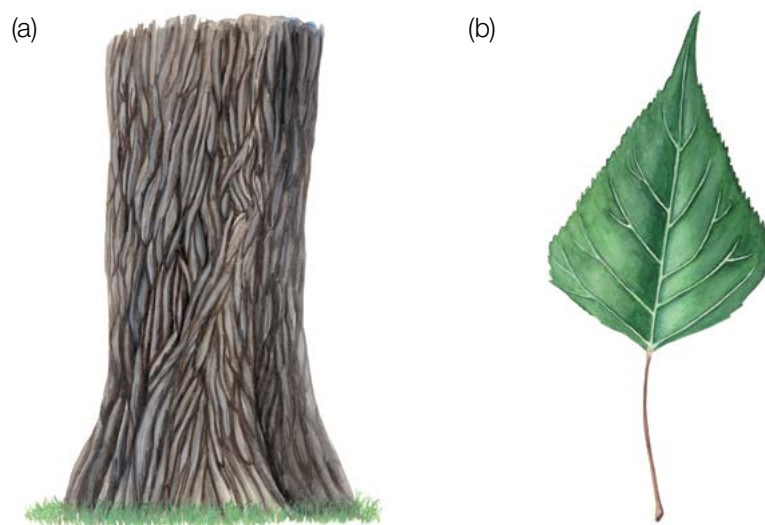
- oblika dreves,
- epikormski poganjki in speči brsti na deblu,

- medsebojno prepletajoče se brazde na skorji v spodnjem delu debla,
- oblike listov (diamantna, romboidna ali trikotna),
- odsotnost bele omele (*Viscum album* L.) v krošnji,
- prisotnost pršic šiškaric iz rodu *Pemphigus* na listnih pecljih.

Izkušnje evropskih projektov (EUROPOP, DANUBEPARKS itd.) kažejo, da je bila večina dreves, ki so jih z upoštevanjem zgoraj omenjenih morfoloških lastnosti izbrali za ohranjanje genov, potrjenih kot »čista« drevesa *Populus nigra* tudi z diagnostičnimi molekularnimi markerji.

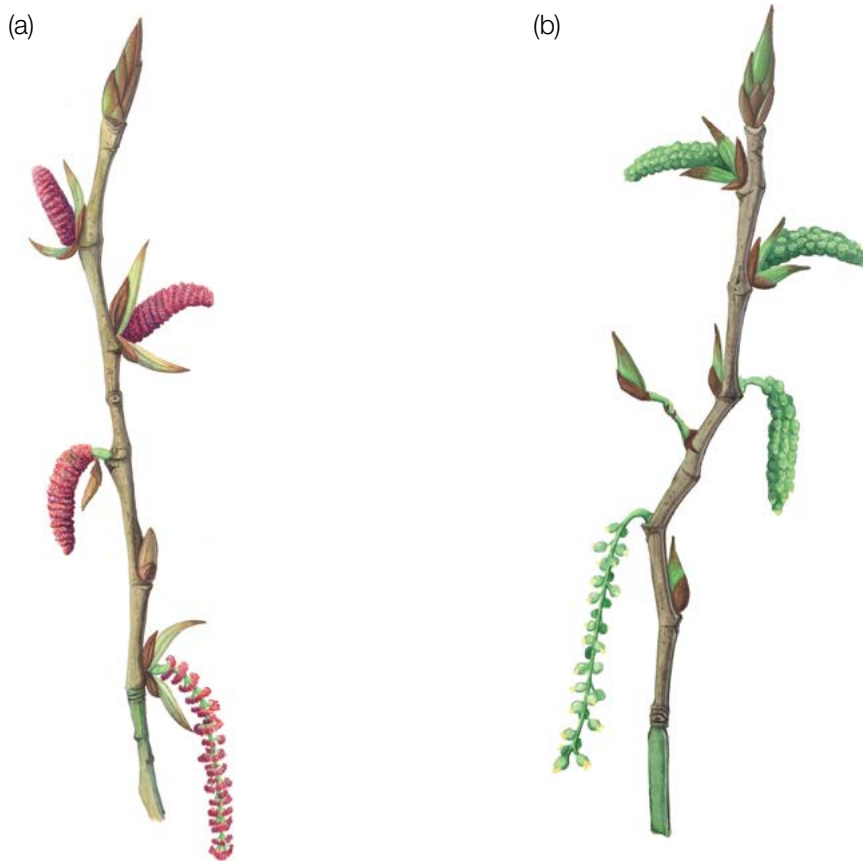


Slika 1: Habitus evropskega črnega topola (*Populus nigra*) brez epikormskih poganjkov (a) in z epikormskimi poganjki, ki se pogosto pojavljajo (b).



Slika 2: Lubje odraslih dreves je temno sivkasto rjavo ali črno s številnimi medsebojno prepletajočimi se globokimi brazdami (a). List evropskega črnega topola z značilno obliko diamanta (romboida) ali trikotnika (b).

Evropski črni topol je dvodomna vrsta. Enospolni moški ali ženski cvetovi (Slika 3) se razvijejo iz posebnih brstov, ki vsebujejo vnaprej oblikovana socvetja [11]. Cvetovi so združeni v viseče mačice na ločenih drevesih, s čimer je onemogočena samooprašitev. Moške mačice imajo rdečkasto vijoličaste prašnike, ženske mačice pa imajo rumeno zelene brazde.



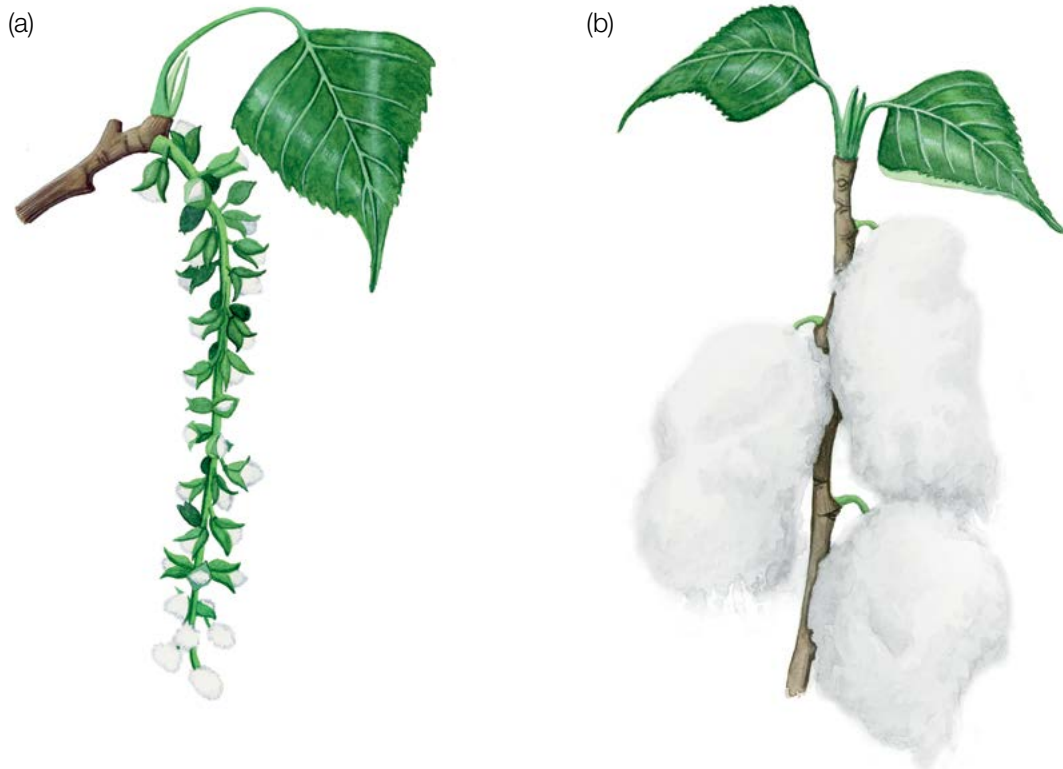
Slika 3: Ugotavljanje spola drevesa: moški cvetovi (a), ženski cvetovi (b), shematično predstavljeni v različnih razvojnih fazah.

3 Razmnoževanje

Moška drevesa so drevesa z izključno moškimi cvetovi, ki sproščajo pelod, ženska drevesa so drevesa z izključno ženskimi cvetovi, ki sproščajo semena. Cvetovi se pojavijo iz posebnih brstov približno teden do dva pred pojavom listov zgodaj spomladi (marca ali aprila) na nižje ležečih območjih in območjih z nižjimi zemljepisnimi širinami; na območjih z višjimi zemljepisnimi širinami in višje ležečih območjih se cvetenje zakasni do maja [15]. Čas in trajanje cvetenja ter dolžina procesa dozorevanja semen so odvisni od fotoperiode in lokalnih temperatur, zato so na različnih lokacijah različni, to pa vpliva na čas sproščanja semen [16]. Morda obstaja tudi genetska komponenta, ki vpliva na zgodnje in pozne fenotipe. Pelod se prenaša z vetrom. Ko so ženski cvetovi oprášeni, na vsaki mačici v 4 do 6 tednih dozori približno od 20 do 50 golih in okroglih zeleno rjavih kapsul (Slika 4a), v katerih se razvije do 250 majhnih svetlo rjavih semen na mačico [17]. Ženske mačice se razvijejo v puhasta semena, ki so podobna bombažu in se prenašajo po zraku ter imajo pritrjene dolge bele svilnate dlačice (Slika 4b). Sprostijo se zgodaj poleti [17].

Evropski črni topol semeni skoraj vsako leto. Semena so sposobna preživeti samo kratek čas (od 1 do 3 dni) ter potrebujejo posebne vodne in talne razmere s substratom, ki mora biti 4 tedne nenehno vlažen, da seme kali [18].

Evropski črni topol se lahko razmnožuje generativno, kot je opisano zgoraj, ali vegetativno, na nespolen način s kloniranjem. Naravno razmnoževanje s kloni je mogoče s poganjki iz korenin, panjev, padlih dreves ali mladih odlomljenih vej [17]. Naravno vegetativno razmnoževanje je mogoče brez mladja, zato lahko tako razmnoževanje prispeva k številčnosti populacije. Pri vrsti *Populus nigra* pogosto nastanejo večdebelni (polikormski) kloni rastlin [2].



Slika 4: Ženska mačica s semenskimi kapsulami, ki dozorevajo (a); na zrelih semenih *Populus nigra* so pritrjene dolge bele svilnate dlačice, kar jim daje puhast in bombažu podoben videz (b).

Identifikacija ploskev za mladje

Evropski črni topol se naravno pomlajuje na rečnih bregovih, na zemljiščih z aluvialnimi ruderalnimi vlažnimi peščenimi in zračnih tlemi, ki nastanejo po sezonskih rečnih poplavih [14] in ne v sestojih pod rodnimi drevesi. Mladje raste ob rekah v pasovih, ki nastajajo v zaporednih časovnih obdobjih, v prepletenih rečnih sistemih pa na posebnih mikromestih (npr. na peščenih nanosih, ki so se nabrali za skupinami vegetacije ali lesenimi naplavinami v depresijah, napolnjenih z muljem, na poplavnih območjih) [17]. Naravno pomlajevanje je neenakomerno in sporadično. Zaradi spreminjanja lokalnih razmer se lahko velikost populacije te vrste sčasoma spreminja (povečuje ali zmanjšuje) [7].

4 Okolje

Evropski črni topol je v naravi široko razširjen po vsej Evropi, razen v nordijskih državah. Razširjen je na območju od severne Afrike do srednje Azije, vključno s Kavkazom in večjim delom Bližnjega vzhoda. Raste vse do Kazahstana in Kitajske [11] ter od morske obale do nadmorske višine 4000 metrov [19]. Na njegovem celotnem naravnem območju razširjenosti kultivirane oblike ali hibridi pogosto izpodrivajo naravne sestoje *Populus nigra* [20]. Evropski črni topol je ohranjen zlasti ob velikih rekah in njihovih pritokih na naplavnih mestih. Evropski črni topol naravno oblikuje metapopulacije, ne pa majhnih izoliranih populacij (Slika 5) [6, 7]. V sestojih se pojavlja kot številna posamezna drevesa (osamela drevesa) ali v manjših skupinah starih dreves. Raste skupaj z belim topolom (*Populus alba* L.), vrbami (*Salix* spp.), jelšo (*Alnus* spp.), javorjem (*Acer* spp.), brestom (*Ulmus* spp.) in včasih hrastom (*Quercus* spp.) (21). Najbolje raste v globokih, srednje težkih tleh s pH od 5,5 do 7,5 in z visoko vsebnostjo hranil. Zaradi samo sporadične prisotnosti v mešanih obrežnih sestojih po navadi ni vključen v redne gozdne inventure.

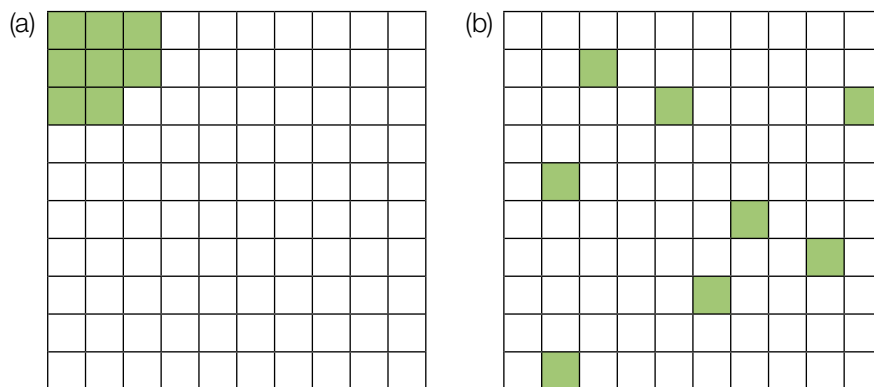
5 Ogroženost

Evropski črni topol je kljub širokemu območju razširjenosti ranljiva in redka drevesa vrsta, ki ji grozi izumrtje na številnih delih njenega območja razširjenosti zaradi človeških vplivov, med katerimi so: i) čezmerno izkoriščanje njegovih naravnih območij; ii) spreminjanje obrežnih ekosistemov; iii) gojenje superiornih hibridov *P. × canadensis* Moench (hibridi med ameriškim črnim topolom (*Populus deltoides* W. Bartram ex Marshall) in evropskim črnim topolom (*Populus nigra*)), ameriškega črnega topola (*Populus deltoides*) in balzamskih topolov (*Populus trichocarpa* Torr. & A. Gray ex. Hook, *Populus maximowiczii* Henry) na njegovem naravnem območju razširjenosti; in iv) introgresija genov zaradi vnosa ženskih hibridnih klonov, ko je njihovo cvetenje usklajeno z moškimi drevesi evropskega črnega topola [22, 14, 11].

Pogost škodljivec na evropskem črnem topolu je rdeča topolovka (*Chrysomela populi* L.), najpogostejši boleznici pa sta topolova rja (*Melampsora larici-populina* Kleb.) in rjava pegavost topolovega listja (*Drepanopeziza punctiformis* Gremmen, znana tudi kot *Marssonina brunnea* (Ellis & Everh.) Magnus). Odmiranje starih dreves evropskega črnega topola je pogosto tudi na njegovih domorodnih območjih zaradi spreminjanja razmer na teh območjih in suše (hitro upadanje nivoja podtalnice). Stara drevesa nazadnje uničijo topolov rak, ki ga povzroča *Plagiostoma populinum* (Fuckel) L. C. Mejía (prej *Cryptodiaporthe populea* (Saccardo) Butin, znana tudi kot *Dothichiza populea* Saccardo), in vetrolomi, zato imajo pri naravnem sukcesijskem razvoju mešanega obrežnega gozda prednost trdolesni listavci.

6 Vzpostavitev in vzdrževanje ploskve

Evropski črni topol je pionirska vrsta v obrežnih mešanih gozdovih. Zanj je značilna struktura metapopulacije v širokem poplavnem sistemu. Gozdni genetski monitoring evropskega črnega topola je treba izvajati na ravni metapopulacije, ki obsega omrežje medsebojno povezanih lokalnih podpopulacij, znotraj katerih se domnevno izmenjujejo pelod in semena, zato ga ne smemo izvajati na enem samem lokalno izoliranem mestu.



Slika 5: Shematski prikaz medsebojno povezanih lokalnih populacij črnega topola ob rečnem sistemu (a) v primerjavi z lokalno izolirano populacijo črnega topola (b).

Če želimo zagotoviti reprezentativno vzorčenje v metapopulaciji, moramo v sistem za genetski monitoring vključevati naključno izbrane ploskve za monitoring odraslih dreves v lokalnih populacijah in njihovih pomladitvenih jeder ob rečnem sistemu. Ploskev za gozdni genetski monitoring evropskega črnega topola obsega toliko ploskev, kolikor je lokalnih populacij, ki sestavljajo metapopulacijo, ki nas zanima. Število dreves na vsaki ploskvi mora biti sorazmerno z velikostjo lokalne populacije, vsega skupaj pa mora biti 50 odraslih (razmnoževalno aktivnih) genetsko različnih in vrstno čistih dreves *Populus nigra*, po možnosti z enako zastopanostjo moških in ženskih osebkov (razmerje med spoloma 1 : 1). Ploskev za monitoring posamezne lokalne populacije naj vključuje vsaj 20 dreves, razporejenih na razdalji do največ 5 kilometrov.

Drevesa je priporočljivo izbrati vnaprej na lokaciji na podlagi ocene morfoloških lastnosti, opisanih pri opisu vrste. Na podlagi rezultatov projektov dolgoročnega ohranjanja genov na Madžarskem [23], pri katerih so uporabili kompleks stabilnih morfoloških značilnosti vrste, vnaprej izbrana drevesa pa so dodatno testirali z diagnostičnimi markerji DNK, je pri vnaprejšnji izbiri v večini primerov mogoče izključiti hibridne in introgresirane genotipe. Toda diagnostične molekularne genetske markerje za ugotavljanje taksonomskega statusa je treba uporabiti v vseh primerih, da se potrđita taksonomska identiteta in nehibridnost testiranih dreves kot čistih osebkov *Populus nigra* [7, 23]. Zato je uporaba genetskih testov z molekularnimi diagnostičnimi markerji ključen element genetskega monitoringa dreves *Populus nigra* na vseh ravneh monitoringa. Poleg tega je treba drevesa testirati tudi za klonalnost z določanjem genotipa (samo en osebek istega genotipa je mogoče vključiti v monitoring). Če drevo cveti, ga obravnavamo kot razmnoževalno aktivno. Za razločevanje med spoloma je postavitve ploskve na terenu najbolje opraviti v času cvetenja. Pri postavljanju ploskve moramo drevesa označiti in opraviti georeferenciranje dreves. Hkrati lahko izmerimo višino in prsni premer ter odvzamemo vzorce za ekstrakcijo DNK.

6.1 Vzpostavitev ploskve

6.1.1 Opredelitev okvira vzorčenja

Preden na terenu postavimo ploskev za gozdni genetski monitoring je treba v programski opremi GIS pripraviti zemljevid metapopulacije evropskega črnega topola. Zato je treba lokacije lokalnih populacij, kjer je gostota vrste zadostna za vzpostavitev ploskve za monitoring, na terenu podrobno preiskati. Med začetnim preiskovanjem je priporočljivo posneti pot z aplikacijo na mobilnem telefonu (npr. Locus map) ali napravo GPS saj si tako bistveno olajšamo nadaljnje načrtovanje.

Lokacije lokalnih populacij se vnesejo na zemljevid v obliki poligonov, ki skupaj sestavljajo okvir vzorčenja. Drevesa znotraj vsake lokalne populacije se izberejo naključno. S pristopom, ki omogoča naključno izbiro, dobimo v programski opremi GIS ustrezno število (sorazmerno z velikostjo lokalne populacije) naključnih koordinat GPS z najmanjšo razdaljo 35 metrov med njimi. Daljšo razdaljo med naključnimi točkami uporabimo zato, da zagotovimo varnostno rezervo za zmanjšano točnost naprav GPS v gozdovih in razdaljo do najbližjega drevesa od naključne točke GPS. Koordinate naključnih točk je treba shraniti v napravi GPS, ki se bo uporabljala na terenu. Če zaradi kompleksnosti rečnih kanalov v poplavnih gozdovih ni mogoče upoštevati navedenih navodil, lahko znotraj vseh lokalnih populacij uporabimo poenostavljen »pristop išči in najdi«: po možnosti ob pomoči revirnega gozdarja je območje, kjer se pojavljajo lokalne populacije, treba preiskati v sistematičnem vzorcu in z uporabo naprave GPS ali aplikacije na mobilnem telefonu za snemanje poti, saj tako zagotovimo, da ne bomo večkrat preiskali istega območja ali spregledali katerega koli dela območja. Koordinate vseh razmnoževalno aktivnih dreves se zapišejo in določi se njihov spol. Za vsako lokalno populacijo se iz skupine ustreznih dreves naključno izbere ustrezno število dreves.

Na vseh ravneh monitoringa je treba pri vseh odraslih drevesih določiti genotip, da izključimo hibride in klone.

6.1.2 Vzpostavitev ploskve na terenu

Potem ko poznamo koordinate približnih lokacij dreves, je postopek za postavitve ploskve pri izbranih lokalnih populacijah naslednji:

- poiščemo shranjene koordinate GPS v gozdnih sestojih,
- izberemo in označimo razmnoževalno aktivno drevo, ki je najbližje shranjeni koordinati GPS.

6.1.3 Označevanje dreves

Vsako izbrano drevo moramo označiti z ustrezno številko in barvno črto okoli debla za večjo vidnost dreves iz vseh smeri.

6.1.4 Vzorčenje za genetske analize

Za oceno hibridizacije in prisotnosti klonov je treba nabrati vzorce za ekstrakcijo DNK za vsa izbrana drevesa. Hibride in klone je treba izključiti ter jih nadomestiti z nehibridnimi osebki z edinstvenimi genotipi (ne kloni). Zato je včasih treba izbrati in vzorčiti večje število dreves, da najdemo 50 dreves evropskega črnega topola, ki niso hibridna ali kloni.

6.2 Monitoring mladja

Načrt vzorčenja naravnega mladja upošteva koncept metapopulacije z več pomladitvenimi jedri (podploskvami), da zajamemo celotno genetsko raznovrstnost evropskega črnega topola ter ocenimo tveganje introgresije genov in hibridizacije zaradi eksotičnih vrst topola in virov lombardskega topola (*Populus nigra* L. var. *italica* Koehne) na danem območju. Pri monitoringu mladja moramo upoštevati učinke poplav in zato nenehno spreminjajoče se oblike teh lokacij, okoljske razmere ali morda celo to, da lahko lokacije z mladjem v celoti izginejo.

Mikrolokacije morebitnega naravnega mladja je treba ob koncu faze obroda zgodaj poleti (zlasti od aprila do junija) pogosto spremljati (vsaj enkrat tedensko), in če odkrijemo na novo vzkaljena pomladitvena jedra, je treba takoj pobrati vzorce potomcev evropskega črnega topola s kalicami ali prvimi listi. Vzorčena pomladitvena jedra je treba vnesti na zemljevid tako, da posnamemo njihove koordinate GPS. Lokacije 20 pomladitvenih jeder poiščemo na območju za gozdni genetski monitoring in dodatno še 0,5 kilometra v obeh smereh rečnega sistema.

V vsakem pomladitvenem jedru na površini 1 m² vzorčimo 5 naključno izbranih rastlin in skupaj pridobimo 100 vzorcev. Če najdemo manj kot 20 pomladitvenih jeder, je treba zbrati sorazmerno več vzorcev v vsakem pomladitvenem jedru. Vse vzorce je potrebno testirati za hibridizacijo in med njimi naključno izbrati 50 vrstno čistih evropskih črnih topolov za nadaljnje analize gozdnega genetskega monitoringa; če ni mogoče pridobiti 50 rastlin čiste vrste iz teh 100 rastlin, je treba opraviti vzorčenje in testiranje dodatne skupine 100 vzorcev, dokler iz pomladitvenih jeder ne pridobimo najmanjšega zahtevanega števila 50 genotipov čistih osebkov *Populus nigra* (L.), ki jih potrebujemo za analizo gozdnega genetskega monitoringa.

6.3 Vzdrževanje ploskve

6.3.1 Splošno vzdrževanje

Označbe odraslih dreves redno (vsaki dve leti) pregledujemo in po potrebi obnovimo.

6.3.2 Nadomeščanje dreves

Če opazovano drevo odmre ali se v okviru gospodarjenja poseka, ga moramo nadomestiti. Izberemo ustrezno drevo, ki je najbližje odmrlemu in izpolnjuje zahtevo po najmanjši oddaljenosti od najbližjega opazovanega drevesa 30 m. Če to ni mogoče, izberemo drevo z obrobja ploskve za gozdni genetski monitoring.

Če ima drevo poškodovano krošnjo, na primer zaradi vetroloma, žledoloma ali snegoloma, a lahko še obrodi, ga v monitoringu obdržimo. Vzrok poškodbe je treba zabeležiti, saj lahko poškodba vpliva na ugotovljene vrednosti verifikatorjev in dodatnih informacij. Če je škoda prehuda in obrod ni več pričakovan, moramo opazovano drevo nadomestiti.

7 Popis verifikatorjev in dodatnih informacij

Molekularno genetsko identifikacijo dreves evropskega črnega topola je treba opraviti z uporabo genetskih markerjev za diagnostiko vrste. Ugotavljanje klonalnosti v metapopulaciji odraslih dreves in mladih pomladitvenih jedrih je prav tako treba izvesti z analizo ustreznih molekularnih genetskih markerjev. Za ločevanje med čisto vrsto in medvrstnimi hibridi potrebujemo nabor preverjenih referenčnih vzorcev obeh (ali celo več) hibridizirajočih vrst.

V splošnem je treba upoštevati naslednje:

- populacija evropskega črnega topola ima strukturo metapopulacije,
- ploskve za gozdni genetski monitoring so »ploskve lokalnih populacij« v metapopulaciji,
- ploskev za gozdni genetski monitoring, izbrana v metapopulaciji ob rečnem sistemu, sestavlja več delnih ploskev za gozdni genetski monitoring s skupnim številom 50 odraslih razmnoževalno aktivnih dreves evropskega črnega topola,
- vsa odrasla drevesa evropskega črnega topola, izbrana za gozdni genetski monitoring, so vključena v opazovanja in meritve,
- na vseh ravneh monitoringa je treba opraviti molekularne genetske analize, da se v monitoring vključijo zgolj osebkii »čiste vrste«. Zato je začetek izvajanja gozdnega genetskega monitoringa za to vrsto bistveno dražji v primerjavi s tistim za drevesne vrste, pri katerih ne prihaja do hibridizacije.

Verifikatorje in dodatne informacije na ploskvi za monitoring redno popisujemo. Z verifikatorji spremljamo genetske lastnosti populacije ter njeno prilagajanje okoljskim spremembam in/ali gospodarjenju, dodatne informacije pa popisujemo za lažje tolmačenje verifikatorjev.

Pri popisu verifikatorjev na višjih ravneh (standardna, napredna) moramo popisati tudi podatke za nižje ravni (osnovna, standardna). Pri popisu dodatnih informacij tega ni treba storiti.

Preglednica 1: Seznam verifikatorjev in dodatnih informacij s kratkim opisom in pogostostjo opazovanja za terensko popisovanje na ploskvah za gozdni genetski monitoring evropskega črnega topola.

Ime	Osnovna raven	Standardna raven	Napredna raven	
Verifikatorji	Mortaliteta/preživetje	Odrasla drevesa: štetje preostalih označenih zrelih dreves vsakih 10 let in po vsakem ekstremnem vremenskem pojavu/motnji	Enaka kot osnovna raven	Enaka kot osnovna raven
		Mladje: mortaliteta/preživetje se ne ocenjuje za to vrsto	/	/
	Cvetenje	Strokovno mnenje na ravni ploskve za gozdni genetski monitoring, vsako leto	Opazovanje na ravni posameznih dreves ob dveh obilnih cvetenjih na desetletje, najbolje v enakomernih časovnih razmikih*	Enaka kot standardna raven, vendar se popisuje tudi faza cvetenja*
	Obrod	Opazovanje na ravni posameznih dreves po dveh obilnih cvetenjih na desetletje, najbolje v enakomernih časovnih razmikih (ne glede na jakost obroda)*	Opazovanje na ravni posameznih dreves, v istem letu kot ocena cvetenja na standardni ravni (ne glede na jakost obroda)*	Štetje plodov (bombažu podobne mačice z zreliimi semenskimi kapsulami), v istem letu kot ocena cvetenja na napredni ravni, ne glede na jakost obroda* Za vsak ocenjeni obrod na napredni ravni naberejo semena za laboratorijske analize
	Obilnost mladja	Strokovno mnenje na ravni celotne ploskve za gozdni genetski monitoring**	Štetje na novo vzkaljenega mladja v do 20 pomladitvenih jedrih po vsakem ocenjenem obilnem obrodu. Hkrati se zberejo tudi vzorci za genetsko analizo**	Enaka kot standardna raven**
Dodatne informacije	Porazdelitev debelinskih razredov	/	Meritev vsakih 10 let	Enaka kot standardna raven
	Porazdelitev višinskih razredov	/	Meritev vsakih 10 let	Enaka kot standardna raven
	Olistanje	/	Opazovanje na ravni posameznih dreves, vsakih 5 let	Opazovanje na ravni posameznih dreves, vsako leto
	Staranje	/	Opazovanje na ravni posameznih dreves, vsakih 5 let	Opazovanje na ravni posameznih dreves, vsako leto
	Usklajenost cvetenja	/	/	Opazovanje na ravni posameznih dreves, ob vsakem ocenjenem obilnem cvetenju

* Najbolje je, da vsako desetletje ocenimo vsaj en obilen obrod. Vendar pa vsakemu obilnemu cvetenju ne sledi nujno obilen obrod. Če ocenjenemu cvetenju ne sledi obilen obrod, moramo oceno cvetenja in obroda ponoviti ob naslednjem obilnem cvetenju, ne glede na to, koliko časa preteče med zaporednima obilnima cvetenjema. Obilno cvetenje in obrod prepoznamo z opazovanjem na osnovni ravni.

** Če po ocenjenem obilnem cvetenju in obrodu ni opaziti nobenih novih pomladitvenih jeter (če, na primer, poplava odnese novo mladje), moramo oceno vseh treh verifikatorjev (cvetenje, obrod in obilnost mladja) ponoviti ob naslednjem obilnem cvetenju, ne glede na to, koliko časa preteče med zaporednima obilnima cvetenjema. Obilno cvetenje in obrod prepoznamo z opazovanjem na osnovni ravni.

7.1 Protokoli za popis verifikatorjev

7.1.1 Mortalitet/preživetje

Mortaliteta opisuje mortaliteto odraslih dreves. Nasprotni pojem, preživetje, pomeni drevesa, ki so od zadnje ocene še živa. Oba parametra se izražata v relativnih enotah, tj. deležu odmrlih oziroma preživelih dreves. Preživetje izračunamo s formulo $1 - \text{mortaliteta}$.

7.1.1.1 Odrasla drevesa: osnovna, standardna in napredna raven

Verifikator Mortalitet odraslih dreves. Ocenimo ga tako, da preštujemo preostala živa označena drevesa vsakih 10 let in po vsakem ekstremnem vremenskem pojavu/motnji. Mortalitet je razlika med začetnim številom označenih dreves in številom še živih dreves izmed prvotnih 50.

7.1.2 Cvetenje

Ta verifikator opisuje jakost cvetenja in delež dreves, ki cvetijo. V srednji Evropi ga je mogoče popisati aprila. Cvetenje je zgodnejše, če je bila zima mila.

7.1.2.1 Osnovna raven

Ta verifikator popišemo vsako leto na ravni sestoja. Popis opravimo, ko je cvetenje v polnem zamahu. Povprečno stanje ocenimo po pregledu celotne ploskve za monitoring. Zabeležimo dva rezultata, enega za jakost cvetenja, izraženega kot povprečni delež krošnje s cvetovi, in drugega za delež cvetočih dreves v sestoji.

Šifra	Jakost cvetenja na ravni sestoja	Povprečni delež krošnje s cvetovi (%)
1	Brez cvetenja: na drevesih ni cvetov ali so cvetovi le ponekod	0–10
2	Šibko cvetenje: na drevesih je nekaj cvetov	> 10–30
3	Zmerno cvetenje: na drevesih je zmerno število cvetov	> 30–60
4	Močno cvetenje: na drevesih je veliko število cvetov	> 60–90
5	Masivno cvetenje: na drevesih je ogromno število cvetov	> 90

Šifra	Delež dreves v sestoji z navedeno jakostjo cvetenja (%)
1	0–10
2	> 10–30
3	> 30–60
4	> 60–90
5	> 90

7.1.2.2 Standardna raven

Ta verifikator popišemo ob dveh obilnih cvetenjih na desetletje, najbolje v enakomernih časovnih razmikih. Popišemo ga na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves. Cvetenje je obilno, ko je na osnovni ravni ocenjeno kot močno ali masivno (šifra 4 ali 5) in je delež dreves z navedeno stopnjo jakosti cvetenja večji od 60 % (šifra 4 ali 5). Popis opravimo, ko je cvetenje v polnem zamahu. Za vsako drevo navedemo en rezultat.

Šifra	Jakost cvetenja	Delež krošnje s cvetovi (%)
1	Brez cvetenja: na drevesu ni cvetov ali so cvetovi le ponekod	0–10
2	Šibko cvetenje: na drevesu je nekaj cvetov	> 10–30
3	Zmerno cvetenje: na drevesu je zmerno število cvetov	> 30–60
4	Močno cvetenje: na drevesu je veliko število cvetov	> 60–90
5	Masivno cvetenje: na drevesu je ogromno število cvetov	> 90

7.1.2.3 Napredna raven

Ta verifikator popišemo ob dveh obilnih cvetenjih na desetletje, najbolje v enakomernih časovnih razmikih. Popišemo ga na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves. Cvetenje je obilno, ko je na osnovni ravni ocenjeno kot močno ali masivno (šifra 4 ali 5) in je delež dreves z navedeno stopnjo jakosti cvetenja večji od 60 % (šifra 4 ali 5).

Za vsako drevo navedemo dva rezultata: faza cvetenja, ter jakost cvetenja. Povprečno sta potrebna dva obiska ploskve, prvi dovolj zgodaj, da opazujemo zgodnje faze cvetenja, in drugi, ko je cvetenje v polnem razmahu. Dodatno informacijo Usklajenost cvetenja lahko ocenimo na podlagi rezultatov za moško in žensko cvetenje, ki jih dobimo za ta verifikator. Faze cvetenja moških in ženskih dreves prikazujeta Sliki 6 in 7.

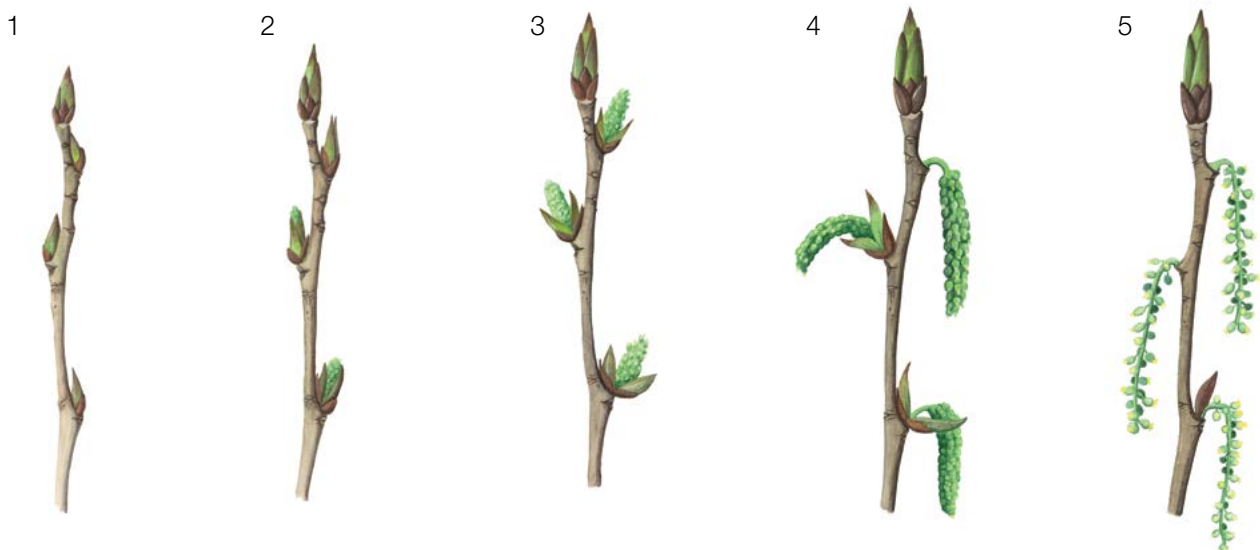
Šifra	Faza ženskega cvetenja
1	Ženski cvetni brsti niso aktivni (rjavi brsti)
2	Ženski cvetni brsti se povečajo in začenjajo brsteti (svetlo zeleni brsti)
3	Dolžinska rast cvetov (kratki svetlo zeleni cvetovi)
4	Cvetovi so odprti (zelenkaste mačice)
5	Cvetovi so odprti (v celoti razviti rumeno zeleni cvetovi v mačicah)

Šifra	Faza moškega cvetenja
1	Moški cvetni brsti niso aktivni (rjavi brsti)
2	Moški cvetni brsti se povečajo in začenjajo brsteti (vidni so svetlo zeleni brsti s prvimi rdečkasto vijoličastimi cvetovi)
3	Dolžinska rast cvetov (kratki rdečkasto vijoličasti cvetovi)
4	Cvetovi so odprti (v celoti razvite mačice z rdečkasto vijoličastimi cvetovi s pelodom)
5	Cvetovi se posušijo in odpadejo

Šifra	Jakost cvetenja za vsako drevo, veljavna za oba spola	Delež krošnje s cvetovi (%)
1	Brez cvetenja: na drevesu ni cvetov ali so cvetovi le ponekod	0–10
2	Šibko cvetenje: na drevesu je nekaj cvetov	> 10–30
3	Zmerno cvetenje: na drevesu je zmerno število cvetov	> 30–60
4	Močno cvetenje: na drevesu je veliko število cvetov	> 60–90
5	Masivno cvetenje: na drevesu je ogromno število cvetov	> 90



Slika 6: Slikovni vodnik za faze razvoja moških cvetov (mačic) na napredni ravni verifikatorja Cvetenje.



Slika 7: Slikovni vodnik za faze razvoja ženskih cvetov (mačic) na napredni ravni verifikatorja Cvetenje.

7.1.3 Obrod

Ta verifikator opisuje prisotnost plodov in njihovo obilnost. Podatke za ta verifikator zbiramo v času obroda, v srednji Evropi večinoma od poznega aprila do junija.

7.1.3.1 Osnovna in standardna raven

Ta verifikator popišemo dvakrat na desetletje, v letih obilnega cvetenja (ne glede na jakost obroda). Popise obroda je najbolje opraviti v enakomernih časovnih razmikih. V istih letih izvedemo tudi oceno cvetenja na standardni in napredni ravni. Popišemo ga na ravni posameznih dreves za vsa opazovana ženska drevesa (idealno 25). Popis opravimo, preden semena začnejo odpadati. Za vsako drevo navedemo en rezultat.

Najbolje je, da po opaženih obilnih cvetenjih zajamemo vsaj en obilen obrod na desetletje. Vendar pa vsakemu obilnemu cvetenju ne sledi nujno obilen obrod. Če ocenjenemu cvetenju ne sledi obilen obrod, moramo oceno cvetenja in obroda ponoviti ob naslednjem obilnem cvetenju, ne glede na to, koliko časa preteče med zaporednima

obilnima cvetenjema. Obrod je obilen, ko je za vsaj 60% ženskih dreves obrod ocenjen kot močen ali masiven (šifra 4 ali 5).

Šifra	Jakost obroda	Delež krošnje s plodovi (%)
1	Brez obroda: na drevesu ni plodov ali so plodovi le ponekod	0–10
2	Šibek obrod: na drevesu je nekaj plodov	> 10–30
3	Zmeren obrod: na drevesu je zmerna količina plodov	> 30–60
4	Močen obrod: na drevesu je veliko plodov	> 60–90
5	Masiven obrod: na drevesu je ogromno plodov	> 90

7.1.3.2 Napredna raven

Ta verifikator popišemo v istih letih kot oceno cvetenja na standardni in napredni ravni (ne glede na jakost obroda). Popišemo ga na ravni posameznih dreves za vsa opazovana ženska drevesa (najbolje 25). Popis opravimo, preden semena začnejo odpadati. Za vsako drevo navedemo en rezultat in zabeležimo kateri del krošnje smo opazovali. Hkrati na 20 ženskih drevesih naberemo seme za testiranje semen in genetsko analizo semen za verifikatorje in dodatne informacije na napredni ravni.

Najbolje je, da po opaženih obilnih cvetenjih zajamemo vsaj en obilen obrod na desetletje. Vendar pa vsakemu obilnemu cvetenju ne sledi nujno obilen obrod. Če ocenjenemu cvetenju ne sledi obilen obrod, moramo oceno cvetenja in obroda ponoviti ob naslednjem obilnem cvetenju, ne glede na to, koliko časa preteče med zaporednima obilnima cvetenjema. Obilen obrod prepoznamo z opazovanjem na osnovni ravni. Obrod je obilen, ko je na osnovni ravni ocenjen kot močen ali masiven (šifra 4 ali 5) za vsaj 60 % ocenjevanih ženskih dreves.

Verifikator popišemo tako, da skozi daljnogled preštejemo plodove (bombažu podobne mačice z zrelemi semenskimi kapsulami). Uporabimo povprečni rezultat treh zaporednih štetij. Rezultat vsakega štetja je število plodov, ki jih opazovalec prešteje v 30 sekundah. Pri vseh drevesih moramo preučevati isti del krošnje. Ko izberemo del krošnje, ki ga bomo opazovali, moramo ob vsakem naslednjem spremljanju tega verifikatorja izbrati isti del krošnje. Zgornja tretjina krošnje je za štetje ustrežnejša od spodnjega in srednjega dela.

Zabeležimo dve vrednosti, število plodov in opazovani del krošnje.

Število plodov, prešteti v 30 sekundah (povprečje 3 štetij)

X

Šifra	Opazovani del krošnje
1	Spodnji
2	Srednji
3	Zgornji

7.1.4 Prisotnost in obilnost mladja

Ta verifikator opisuje prisotnost in obilnost mladja na ploskvi za monitoring.

7.1.4.1 Osnovna raven

Ta verifikator popišemo na ravni celotne ploskve za gozdni genetski monitoring, vsako leto od pozne pomladi do zgodnjega poletja. Za oceno uporabimo strokovno mnenje glede na stanje na celotnem območju gozdnega genetskega monitoringa. Zabeležimo dve vrednosti, eno za novo mladje (mladje, ki je vzkalilo v istem letu kot se opravlja opazovanje) in eno za starejše mladje (mladje, ki je starejše od enega leta).

Šifra Opis: novo mladje (na novo vzkaljeno mladje starosti do enega leta)

1a Na ploskvi ni novega mladja ali ga je zelo malo

2a Na ploskvi je zadostna količina novega mladja

Šifra Opis: starejše mladje (mladje starejše od enega leta)

1b Na ploskvi ni starejšega mladja ali ga je zelo malo

2b Na ploskvi je zadostna količina starejšega mladja



Slika 8: Mladika evropskega črnega topola z značilnimi kalicami ali prvimi razvitimi listi.

7.1.4.2 Standardna in napredna raven

Ta verifikator popišemo s štetjem na novo vzkaljenega mladja (Slika 8) po vsakem ocenjenem obilnem obrodu v do 20 pomladitvenih jedrih. Za evropski črni topol ne vzpostavimo podploskev za monitoring mladja, ker pričakujemo veliko izgubo mladja zaradi rednih rečnih poplav. Zato štetje opravimo samo enkrat, in to takoj po kalitvi, preživetja/mortalitete mladja pa za to vrsto ne ocenjujemo. Obenem se naberejo vzorci mladja za genetske analize.

Štetje mladja:

Prešteti moramo vse na novo vzkaljeno mladje evropskega črnega topola (mladje starosti do enega leta) v vsakem izmed 20 pomladitvenih jeder. Starejšega mladja evropskega črnega topola ne štejemo.

Če po ocenjenem obilnem cvetenju in obrodu ni opaziti nobenih novih pomladitvenih jeder (če, na primer, poplava odnese na novo vzkaljeno mladje), moramo oceno vseh treh verifikatorjev (cvetenje, obrod in obilnost mladja) ponoviti ob naslednjem obilnem cvetenju, ne glede na to, koliko časa preteče med zaporednima obilnima cvetenjema. Obilno cvetenje in obrod prepoznamo z opazovanjem na osnovni ravni.

Če se v 5 zaporednih letih monitoringa ne oblikuje nobeno novo pomladitveno jedro (po dveh obilnih obrodih v desetletju), se naravno mladje oceni in vzorči za genetske analize enkrat na desetletje na pomladitvenih jedrih s starejšim mladjem. V teh primerih je treba oceniti in popisati približno starost naravnega mladja.

Rezultat štetja mladja starosti do enega leta na podploskvi

X

7.2 Protokoli za popis dodatnih informacij

7.2.1 Porazdelitev debelinskih razredov

7.2.1.1 Standardna in napredna raven

Prsni premer popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves, vsakih 10 let. Prsni premer je premer debla na višini debla 1,30 m, tj. približno v višini prsi odraslega človeka. Če ima drevo več kot eno deblo, izmerimo vsa in zabeležimo povprečno vrednost (vendar se skušamo izogniti drevesom s številnimi majhnimi debli). V opombe zapišemo, da je drevo večdebello, in zabeležimo število izmerjenih debel. Če je drevo nagnjeno, prsni premer izmerimo pravokotno na drevesno deblo. Prsni premer lahko izmerimo na dva načina:

- 1) s premerko: v tem primeru izmerimo dva pravokotna premera, pravokotno eden na drugega, in izračunamo povprečje;
- 2) z meritvijo obsega drevesa, iz katerega izračunamo premer (delimo ga s številom π , $\sim 3,14$, ali uporabimo pi-meter).

Prsni premer zapisujemo v cm. Pri vsakem naslednjem merjenju moramo uporabiti isto merilno metodo.

7.2.2 Porazdelitev višinskih razredov

7.2.2.1 Standardna in napredna raven

Višino popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves, vsakih 10 let. Višino izmerimo od tal do najvišjega dela krošnje, najbolje s klinometrom ali višinomerom (npr. merilna naprava Vertex). Višino beležimo v metrih na eno decimalno mesto natančno. Če je krošnja poškodovana, moramo v opombe zapisati tudi to, skupaj z razlogom poškodbe.

7.2.3 Olistanje

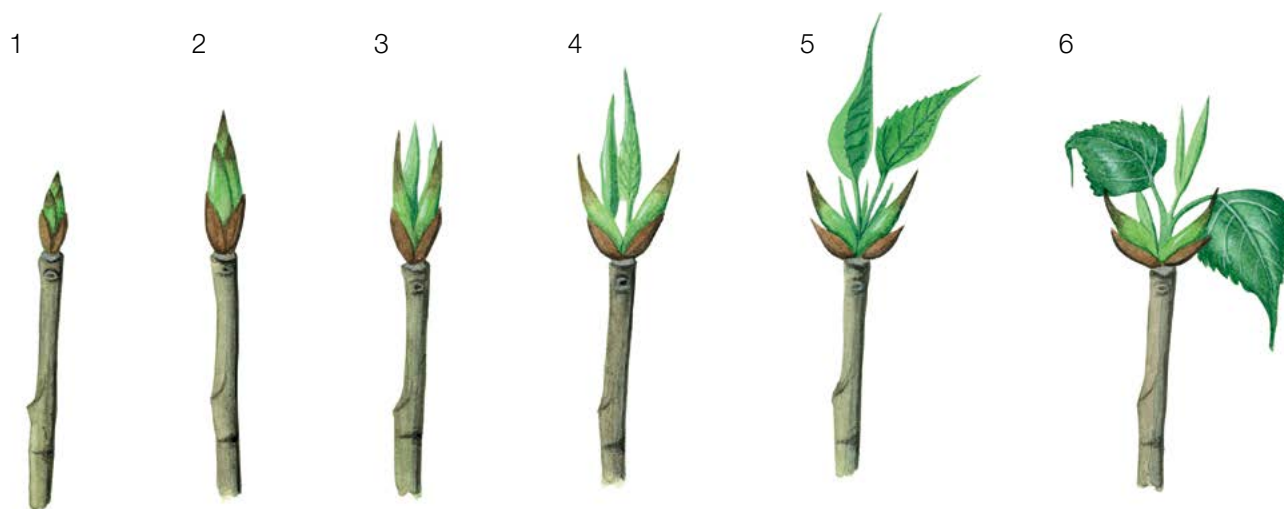
Olistanje opisuje razvoj mladih listov. Popis tega parametra opravimo samo na standardni in napredni ravni. Pri evropskem črnem topolu se olistanje začne pozneje kot cvetenje. Podatke za to dodatno informacijo v srednji Evropi zberemo med marcem in majem. Olistanje je zgodnejše, če je bila zima mila.

7.2.3.1 Standardna raven

Na standardni ravni olistanje popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves, vsakih 5 let. Za vsako drevo zabeležimo dve oceni: faza olistanja in delež krošnje z navedeno fazo olistanja. Faze olistanja prikazuje Slika 9.

Šifra	Faza olistanja
1	Speči brst: Od brstov, ki jih popolnoma obdaja luska, do prvega znaka nabrekanja
2	Nabrekanje: Brsti nabrekajo, luska delno odstopi
3	Odpiranje: Brsti poganjajo
4	Ločitev listov: Brsti so popolnoma odprti, listi so še vedno združeni
5	Listi rastejo v dolžino: Listi so medsebojno ločeni, vendar še ne popolnoma razprti
6	Navpična rast: Listi so popolnoma razprti in v celoti razviti

Šifra	Delež krošnje z navedeno fazo olistanja (%)
1	> 0–33
2	> 33–66
3	> 66–99
4	100



Slika 9: Slikovni vodnik za opisovanje olistanja na standardni in napredni ravni za dodatno informacijo Olistanje.

7.2.3.2 Napredna raven

Na napredni ravni olistanje popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves, vsako leto. Zanimata nas začetek (3. faza) in konec olistanja (6. faza). Opazovanje se preneha, ko vsa drevesa dosežejo 6. fazo. Običajno je potrebnih 6 obiskov ploskve. Vrednosti (faza olistanja in delež krošnje z navedeno fazo olistanja) so v razdelku 7.2.3.1, Standardna raven.

7.2.4 Senescenca

Senescenca opisuje proces senescence listov. Popis tega parametra opravimo samo na standardni in napredni ravni.

7.2.4.1 Standardna raven

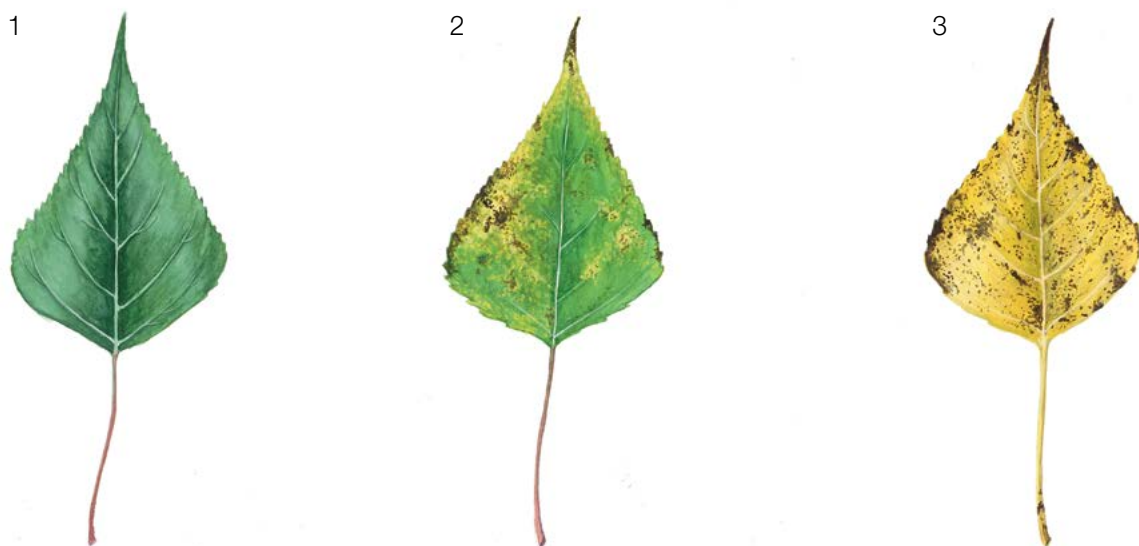
Na standardni ravni senescenco popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves vsakih 5 let. Zanima nas 3. faza, ko so listi rumeni in v njih več ne poteka fotosinteza. Opazovanje se preneha, ko vsa drevesa dosežejo 3. fazo. Običajno sta potrebna dva (2) obiska ploskve. Za vsako drevo zabeležimo dve oceni: faza senescence in delež krošnje z navedeno fazo senescence. Faze senescence prikazuje Slika 10.

Šifra	Faza senescence
1	Listi so zeleni
2	Listi so zelene barve, ki se spreminja v rumeno (zelenkasto rumena)
3	Listi so rumene barve, ki se spreminja v rjavo (rjavkasta)
4	Listi so rjavi/odpadli

Šifra	Delež krošnje z navedeno fazo senescence (%)
1	> 0–33
2	> 33–66
3	> 66–99
4	100

7.2.4.2 Napredna raven

Senescenco popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves, vsako leto. Zanima nas 3. faza, ko so listi rumeni in v njih več ne poteka fotosinteza. Opazovanje se preneha, ko vsa drevesa dosežejo 3. fazo. Običajno sta potrebna 2 obiska ploskve. Vrednosti (faza senescence in delež krošnje z navedeno fazo senescence) so v razdelku 7.2.4.1, Standardna raven.



Slika 10: Slikovni vodnik za opisovanje senescence (4. faza ni prikazana) na standardni in napredni ravni za dodatno informacijo Senescenca.

7.2.5 Usklajenost cvetenja

7.2.5.1 Napredna raven

Usklajenost cvetenja spremljamo samo na napredni ravni na podlagi podatkov, zbranih za verifikator Cvetenje (glejte 7.1.2.3). S to informacijo ugotavljamo, ali sta moško in žensko cvetenje v spremljanem sestoju časovno usklajeni.

Za vzpostavitev ploskve uporabite obrazec »GGM - Opis ploskve«.

Za popis verifikatorjev uporabite »GGM - Terenski verifikatorji«.

Za popis dodatnih informacij uporabite »GGM - Terenske dodatne informacije«.

8. Viri

- Smulders MJM, Cottrell JE, Lefèvre F, van der Schoot J, Arens P, Vosman B, Tabbener HE, Grassi F, Fossati T, Castiglione S, Krystufek V, Fluch S, Burg K, Vornam B, Pohl A, Gebhardt K, Alba N, Agúndez D, Maestro C, Notivol E, Volosyanchuk R, Pospíšková M, Bordács S, Bovenschen J, van Dam BC, Koelewijn HP, Halfmaerten D, Ivens B, van Slycken J, Vanden Broeck A, Storme V, Boerjan W (2008) Structure of the genetic diversity in black poplar (*Populus nigra* L.) populations across European river systems: Consequences for conservation and restoration. *Forest Ecol Manag* 255(5–6):1388–1399. DOI:10.1016/j.foreco.2007.10.063
- Lefèvre F, Barsoum N, Heinze B, Kajba D, Rotach P, de Vries S, Turok J (2001). EUFORGEN Technical Bulletin: *In situ* conservation of *Populus nigra*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome
- Lefèvre F, Bordács S, Cottrell JE, Gebhardt K, Smulders MJM, Vanden Broeck A, Vornam B, van Dam BC (2002) Recommendation for riparian ecosystem management based on the general frame defined in EUFORGEN and results from EUROPOP. In: van Dam BC, Bordács S (eds) Genetic diversity in river populations of European Black Poplar. (Implications for riparian eco-system management), Csizsár Nyomda, Budapest, pp 157-161
- Jelić M, Patenković A, Skorić M, Mišić D, Kurbalija Novičić Z, Bordács S, Varhidi F, Vasić I, Benke A, Frank G, Šiler B (2015) Indigenous forests of European black poplar along the Danube River: genetic structure and reliable detection of introgression. *Tree Genet Genomes* 11:89 <https://doi.org/10.1007/s11295-015-0915-5>
- Eckenwalder JE (1996) Systematics and evolution of *Populus*. In: Stettler RF, Bradshaw HD. Jr, Heilman PE, Hinckley TM (eds) *Biology of Populus and Its Implications for Management and Conservation*. NRC Research Press, Ottawa, pp. 7–32. <https://doi.org/10.1139/9780660165066>
- Rotach P (2001) General consideration and basic strategies. In: Lefevre F, Barsoum N, Heinze B, Kajba D, Rotach P, de Vries SMG, Turok J (eds) EUFORGEN technical bulletin: in situ conservation of *Populus nigra*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, pp 8-15
- Heinze B, Lefevre F (2001) Genetic considerations for the restoration of riparian populations. In: Lefevre F, Barsoum N, Heinze B, Kajba D, Rotach P, de Vries SMG, Turok J (eds) EUFORGEN technical bulletin: in situ conservation of *Populus nigra*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, pp 25–35
- Allegri E (1971) Identification of species and varieties of poplar indigenous in Italy. *Annali dell Istituto Sperimentale per la Selvicoltura* 2:1-62
- Popivshchy II; Prokazin AE; Routkovsky LV (1997) Black poplar in the Russian Federation. In: Turok J, Lefèvre F, de Vries S, Toth B (eds) *Populus nigra* Network. Report of the third meeting, Sarvar, Hungary, 5-7 October 1996, IPGRI, Rome, pp 46-52.
- Dickmann D, Kuzovkina J (2014) Poplars and Willows in the World, With Emphasis on Silviculturally Important Species. In: Isebrands JG, Richardson J (eds) *Poplars and Willows: Trees for Society and the Environment*. FAO UN, CABI, Rome, pp 8-91. <http://dx.doi.org/10.1079/9781780641089.0008>
- de Rigo D, Enescu CM, Houston Durrant T, Caudullo G (2016) *Populus nigra* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: San-Miguel-Ayaz J, de Rigo D, Caudullo G, Houston Durrant T, Mauri A (eds) *European Atlas of Forest Tree Species*. Publ. Off. EU, Luxembourg, pp 136-137. DOI: 10.2788/4251
- Fitschen JB (2002) *Gehölzflora*. Quelle & Meyer Verlag, Wiebelsheim, pp 45-1; 45–7
- Roloff A, Bärtels A (2006) *Flora der Gehölze*. Eugen UlmerKG, Stuttgart, pp 457–464

14. Vanden Broeck A (2003) Technical guidelines for genetic conservation and use of European Black Poplar (*Populus nigra* L.). International Plant Genetic Resources Institute, Rome
15. Braatne JH, Rood SB, Heilman PE (1996) Life history, ecology, and conservation of riparian cottonwoods in North America. In: Stettler RF, Bradshaw HD, Heiman PE, Hinckley TM (eds.) *Biology of Populus and its Implications for Management and Conservation*. NRC Research Press, Ottawa, pp 57–80. <https://doi.org/10.1139/9780660165066>
16. Mahoney JM, Rood SB (1998) Streamflow requirements for cottonwood seedling recruitment—an integrative model. *Wetlands* 18:634–645. <https://doi.org/10.1007/BF03161678>
17. Barsoum N (2001) Regeneration requirements and promotion measures. In: Lefevre F, Barsoum N, Heinze B, Kajba D, Rotach P, de Vries SMG, Turok J (eds) *EUFORGEN technical bulletin: insitu conservation of Populus nigra*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, pp 16–24
18. Guilloy-Froget H, Muller E, Barsoum N, Hughes FMR (2002) Dispersal, germination, and survival of *Populus nigra* L. (*Salicaceae*) in changing hydrologic conditions. *Wetlands* 22:478–488. [https://doi.org/10.1672/0277-5212\(2002\)022\[0478:DGASOP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1672/0277-5212(2002)022[0478:DGASOP]2.0.CO;2)
19. Richardson J, Isebrands JG, Ball JB (2014) Ecology and Physiology of *Populus* and Willows. In: Isebrands JG, Richardson J (eds) *Poplars and Willows: Trees for Society and the Environment*. CAB International, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), pp 92-123. <http://dx.doi.org/10.1079/9781780641089.0008>
20. Zsuffa L (1974) The genetics of *Populus nigra* L. *Annales Forestales* 6:29–53
21. Ballian D (2017) Varijabilnost crne topole (*Populus nigra* L.) i njeno očuvanje u Bosni i Hercegovini. (Variability of Black poplar (*Populus nigra* L.) and its preservation in Bosnia and Herzegovina). Forestry Faculty of the University of Sarajevo/Silva Slovenica – Slovenian Forestry Institute Publishing Centre, Sarajevo/Ljubljana.
22. Lefèvre F, Légionnet A, de Vries S, Turok J (1998) Strategies for the conservation of a pioneer tree species, *Populus nigra* L., in Europe. *Genet Sel Evol* 30:S181 <https://doi.org/10.1186/1297-9686-30-S1-S181>
23. Bordács S, Bach I (2014) Restoration and afforestation with *Populus nigra* in Hungary. In: Bozzano M, Jalonen R, Thomas E, Boshier D, Gallo L, Cavers S, Bordács S, Smith P, Loo J (eds) *Genetic considerations in ecosystem restoration using native tree species: State of the World's Forest Genetic Resources. Thematic study*, Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), pp 233-235. <http://www.fao.org/3/a-i3938e.pdf>. Pridobljeno 10 avgust 2020
24. EUFORGEN Identification Sheet of *Populus nigra* L. http://www.euforgen.org/fileadmin/templates/euforgen.org/upload/Publications/Other_PDFs/Pop_nigra_IdSheets/English.pdf. Accessed 10 August 2020

Za veljavno znanstveno nomenklaturu vrst so bili uporabljeni sledeči viri:

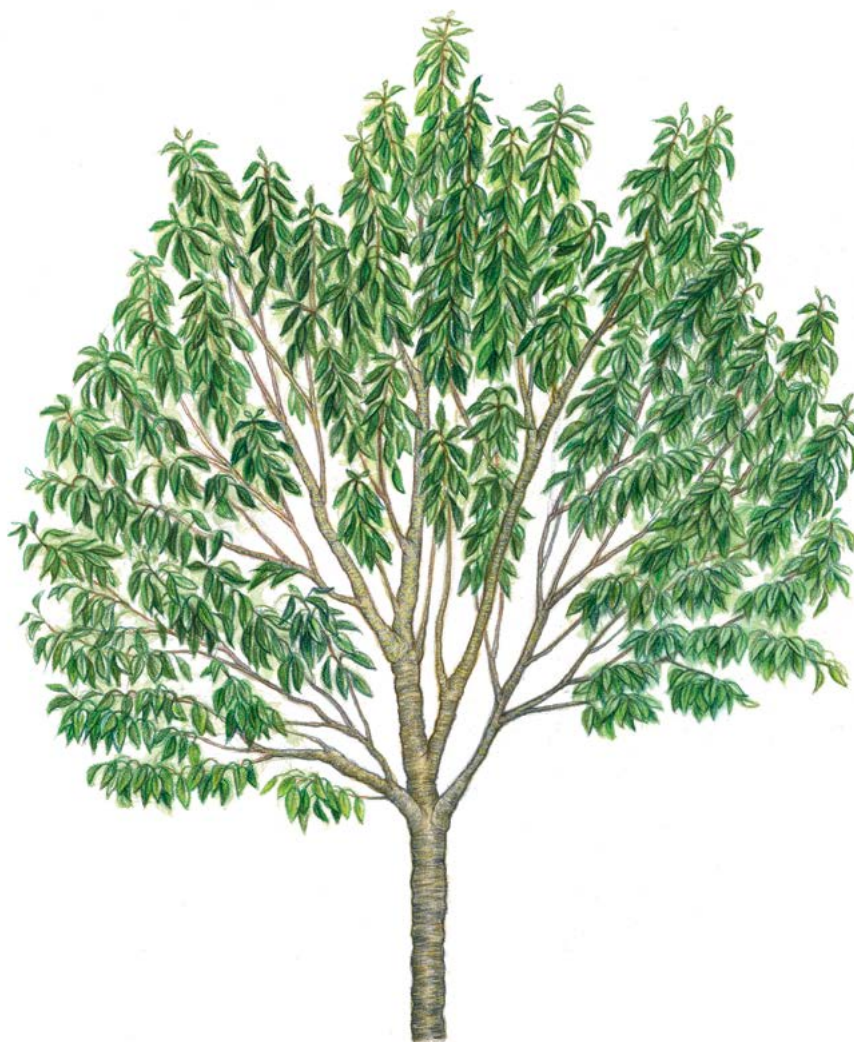
- a. CABI (2020) *Invasive Species Compendium*. CAB International, Wallingford, UK. www.cabi.org/isc. Pridobljeno 15 December 2020
- b. EPPO (2020) *EPPO Global Database* (available online). <https://gd.eppo.int>. Pridobljeno 15 december 2020
- c. GBIF (2020) *Global Biodiversity Information Facility*. <https://www.gbif.org> Pridobljeno 15 december 2020
- d. IPNI (2020) *International Plant Names Index*. The Royal Botanic Gardens, Kew, Harvard University Herbaria & Libraries & Australian National Botanic Gardens. <http://www.ipni.org>, Pridobljeno 10 december 2020
- e. National Center for Biotechnology Information (NCBI) (1998) *National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, Bethesda (MD)*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Pridobljeno 15 december 2020
- f. Stevens PF (2001) *Angiosperm Phylogeny Website, Version 14*. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Pridobljeno 15 december 2020
- g. The Plant List (2013) *Version 1.1*. <http://www.theplantlist.org/>. Pridobljeno 12 december 2020
- h. Tropicos.org (2020) *Missouri Botanical Garden*. <http://www.tropicos.org>. Pridobljeno 15 december 2020
- i. WFO (2020) *World Flora Online*. <http://www.worldfloraonline.org>. Pridobljeno 15 december 2020

Smernice za gozdni genetski monitoring

9.2.6 divje češnje (*Prunus avium* (L.) L.)

Darius KAVALIAUSKAS¹, Barbara FUSSI¹, Filippos ARAVANOPOULOS², Paraskevi ALIZOTI², Dalibor BALLIAN^{3,4}, Nikos TOURVAS², Gregor BOŽIČ³, Evangelos BARBAS², Marjana WESTERGRE³, Marko BAJC³, Rok DAMJANIČ³, Hojka KRAIGHER³

Ilustracije: Teja MILAVEC



Navedba: Kavaliauskas in sod. (2020) Smernice za gozdni genetski monitoring divje češnje (*Prunus avium* (L.) L.). V: Bajc in sod. (ur.) Priročnik za gozdni genetski monitoring. Gozdarski inštitut Slovenije: Založba Silva Slovenica, Ljubljana, str. 255-270. <http://dx.doi.org/10.20315/SFS.168>

Povezane ustanove:

1. Bavarski urad za gozdno genetiko (AWG), Nemčija
2. Aristotelova univerza v Solunu (AUTH), Grčija
3. Gozdarski inštitut Slovenije (GIS), Slovenija
4. Univerza v Sarajevu, Fakulteta za gozdarstvo, Bosna in Hercegovina

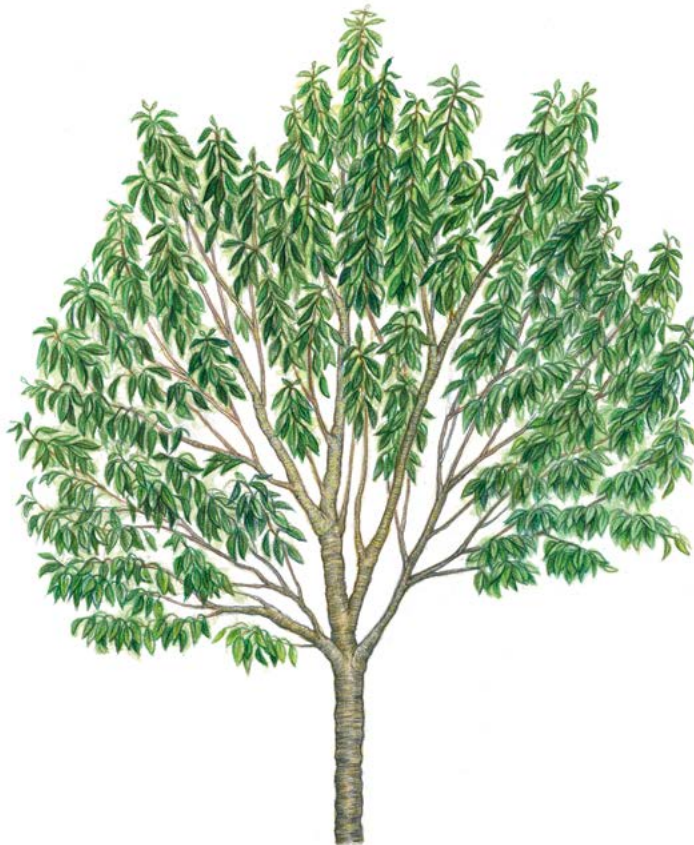
1 Povzetek

Divja češnja (*Prunus avium* (L.) L.) je srednje veliko, hitro rastoče in razmeroma kratkoživo listopadno drevo s širokim naravnim območjem razširjenosti, ki obsega zahodno Evrazijo in severni del Afrike [1]. Je pionirska drevesna vrsta, ki raste na raznolikih rastiščih, vendar pa je na celotnem območju razširjenosti izredno manjšinska, saj je zelo svetloljubna in slabo konkurira drugim vrstam. Za naravne populacije divje češnje je značilna razpršenost, pojavljajo se v majhnih skupinah ali kot posamična drevesa, ki rastejo na gozdnem robu in v vrzelih v gozdnih sestojih. Divja češnja je pomembna gozdna drevesna vrsta z ekološkega (za številne vrste ptic in žuželk je življenjsko pomemben vir prehrane) in ekonomskega vidika (les divje češnje je visoke vrednosti in kakovosti, njegova obdelava je enostavna, zato se pogosto uporablja v proizvodnji furnirja in pohištva, pri izdelavi omar itd.).

V teh smernicah so na kratko opisani divja češnja, njeno razmnoževanje, rastiščne zahteve in dejavniki, ki jo lahko ogrožajo. Smernice vsebujejo tudi napotke za vzpostavitev ploskve za genetski monitoring in popis vseh terenskih verifikatorjev ter dodatnih informacij.

2 Opis vrste

Divja češnja (Slika 1) je srednje veliko, hitro rastoče in razmeroma kratkoživo listopadno drevo, ki zraste 15–30 m visoko (do 35 m) in ima premer debla (prsni premer) do 90–120 cm [3, 4, 5, 16, 19 ter tam navedeni viri]. Za divjo češnjo je značilna močna vršna rast, večina njenih stranskih vej je razporejena v enoletna vretenca. Krošnja je široko stožčasta, deblo pa običajno ravno. Lubje je svetleče z velikimi lenticelami in se vodoravno lupi [16, 19]. Listi so spomladi svetlo zeleni, poleti temno zeleni, jeseni pa rumeni, oranžni ali rdečkasto rjavi. So premenjalno razporejeni, povešeni, enostavni, eliptično jajčasti do narobe jajčasti in priostreni, na robovih pa imajo rahlo zaobljene zobce. Na pecljih, ki so dolgi od 2 do 3,5 cm, so pod listnimi ploskvami jasno vidni pari temno rdečih žlez [19].



Slika 1: Habitus divje češnje (*Prunus avium*).

3 Razmnoževanje

Divja češnja je vrsta z mešanim razmnoževalnim sistemom, ki obsega vegetativno razmnoževanje s poganjki iz korenin in spolno razmnoževanje. Vrsta je enodomna in dvospolna z običajno petštevimi pecljati cvetovi, ki imajo bele venčne liste in so na brahiblastih združeni v skupine od tri do deset ali več cvetov [3, 9]. Cvetove oprashi žuželke, večinoma medonosne in divje čebele ter čmrliji [2, 3, 5, 16, 19]. Cvetenje in semenitev se pri divji češnji v optimalnih pogojih začeta pri starosti 4–6 let. Je eno izmed prvih dreves, ki spomladi cvetijo, in ustvari veliko količino belega cvetja. Mali rdeči ali črni plodovi so užitni (Slika 2) [2, 6]. Seme raznašajo ptice in majhni sesalci [5, 16, 19]. Dormanca semena traja eno ali dve zimi. Za kalitev shranjenega semena se uporablja kombinacija tople in hladne stratifikacije [16].



Slika 2: Razvoj plodov divje češnje (*Prunus avium*).

Za spolno razmnoževanje vrste je značilen gametofitni sistem samonekompatibilnosti (nadzoruje ga alel »S«), ki daje prednost opraševanju med nesorodnimi osebkami in preprečuje samooprašitev [7, 11, 12, 15, 16, 17, 9 ter tam navedeni viri]. Lahko se križa z drugimi vrstami češenj, zlasti tam, kjer se njihova naravna območja razširjenosti prekrivajo, npr. z domačo češnjo, višnjo (*Prunus cerasus* L.) ali stepsko višnjo (*Prunus fruticosa* Pall.) [7, 14, 16, 18], in kjer raste v bližini območij pridelave češenj.

Glede na strategijo lokalne naselitve divje češnje vezano na njen mešani razmnoževalni sistem, se nova rastišča lahko vzpostavijo z vraščanjem mladja, nastalega iz semena, če temu sledi vegetativno razmnoževanje s poganjki iz korenin [13].

4 Okolje

Vrsta je pionirska in raste na raznolikih rastiščih, vseeno pa zaradi šibke konkurenčnosti in izrazite svetloljubnosti spada v kategorijo vrst z manjšinsko razširjenostjo. Naravne populacije divje češnje so omejene velikosti, pojavljajo se v majhnih skupinah ali kot posamična drevesa na gozdnem robu in v vrzelih v gozdnih sestojih, nastalih zaradi motenj v gozdovih [16]. V zgodnjih fazah sukcesijskega razvoja gozda vrsta hitro osvoji čistine (vrzeli) s semenom ali poganjki iz korenin, vendar jo pozneje v sukcesijskem razvoju gozda pogosto izločijo drugi listavci (klimaksne drevesne vrste) [16, 19]. Divja češnja ima najraje globoka, lahka muljasta tla (pH 5,5–8,5), ki so rodovitna in dobro preskrbljena z vodo (letne padavine 580–1800 mm). Odporna je na mrzle zime, vendar lahko spomladanska pozeba poškoduje cvetje. V jedru območja razširjenosti najdemo vrsto v mešanih listopadnih gozdovih združb iz razreda listopadnih gozdov evrosibirske regije (*Quercus-Fagetea*), javorjevih gozdovih v grapah in na pobočnih gruščih (*Tilio-Acerion*), hrastovo belogabrovih gozdovih (*Carpinion betulii*), nižinskih bukovih gozdovih (*Fagion*) in obrečnih poplavnih gozdovih (*Alno-Ulmion*) [19 ter tam navedeni viri].

5 Ogroženost

Zaradi ciljev gospodarjenja z gozdovi, ki niso dovolj upoštevali specifičnih potreb divje češnje, pogoji za rast divje češnje v preteklosti niso bili najboljši. V zadnjih desetletjih je pomen divje češnje za izboljšanje biotske raznovrstnosti gozdnih ekosistemov bolje prepoznan in lastniki gozdov v svojih gozdovih spodbujajo njeno rast [9]. Vrsta je razmeroma občutljiva na stresne okoljske dejavnike (npr. sušo) in je v neugodnih razmerah zelo dovzetna za bolezni in škodljivce. Poleg tega so za njen koreninski sistem značilne široko razraščene stranske korenine v zgornjih talnih horizontih, zato je manj odporna na močan veter [9, 19 ter tam navedeni viri]. Korenine lahko napadejo miši in voluharji, mladje divje češnje pa je še posebej izpostavljeno objedanju. Liste lahko poškodujejo gosenice, na primer gosenice malega zimskega pedica (*Operophtera brumata* L.) in navadnega gobarja (*Lymantria dispar* L.); plodove napadeta češnjeva muha (*Rhagoletis cerasi* L.) in hrošč *Anthonomus rectirostris* L.. Divjo češnjo lahko poškodujejo tudi povzročitelji bakterijskega raka, kot je *Pseudomonas syringae* Van Hall in hrušev ožig (*Erwinia amylovora* Burrill), virus zvijanja listov češnje (CLRV) ter glivni patogeni (*Apiognomonina erythrostoma* Höhnelt, *Blumeriella jaapi* (Rehm) Arx) [19 ter tam navedeni viri].

6 Vzpostavitev in vzdrževanje ploskve

Ploskev za gozdni genetski monitoring sestavlja 50 razmnoževalno aktivnih dreves, ki so drugo od drugega oddaljena najmanj 30 m. Če drevo cveti, ga obravnavamo kot razmnoževalno aktivno. Če ploskev vzpostavljamo zunaj časa cvetenja, lahko za prepoznavanje razmnoževalno aktivnih dreves uporabimo prsni premer in socialni položaj drevesa, pri čemer se opiramo na strokovno znanje revirnega gozdarja. Pri postavljanju ploskve moramo drevesa označiti in zabeležiti koordinate vseh dreves. Hkrati lahko izmerimo prsni premer in odvzamemo vzorce za ekstrakcijo DNK.

Zaradi hibridizacije divje češnje z gojenimi sortami češnje je priporočljivo, da ploskve za GGM izberemo in vzpostavimo na varni razdalji (8–10 km) od nasadov domače češnje.

Zaradi razpršene porazdelitve in majhne gostote divje češnje v naravnih gozdnih sestojih je potrebna predhodna preučitev terena; velikost in oblika ploskve za genetski monitoring morata biti prilagojeni tako, da ploskev vsebuje 50 razmnoževalno aktivnih dreves. Poleg tega mora biti na ploskvi prisotno naravno mladje (v skupinah ali kot posamični osebki). Vseeno je priporočljivo, da se velikost ploskve omeji na 10 ha, sicer lahko postopki GGM (vzorčenje, fenološko opazovanje itd.) postanejo preveč zapleteni in zamudni. Pri izbiri dreves divje češnje je pomembno, da se izognemo morebitnim klonom, zato moramo v primeru skupin, ki jih tvorijo drevesa z le enim genotipom, za GGM izbrati samo eno drevo iz skupine. Zaradi tega je v primeru divje češnje genotipizacijo odraslih dreves treba opraviti tudi na osnovni ravni monitoringa.

Potrebna oprema:

- naprava za merjenje razdalje (priporoča se daljnogled z laserskim daljinomerom),
- kompas,
- barva s čopičem ali pršilko za označevanje dreves,
- premerka za merjenje prsnega premera,
- naprava GPS, ki je dovolj natančna in omogoča shranjevanje koordinat dreves.

6.1 Vzpostavitev ploskve

6.1.1 Izbira ploskve

Najustreznejši čas za začetna dela pri vzpostavljanju ploskve za monitoring divje češnje je spomladi, ko drevesa cvetijo. Spomladi divjo češnjo od drugih vrst na območju jasno razločimo po belo obarvanem cvetju. Namesto začetne preučitve terena ali poleg nje lahko za oceno približnega števila, gostote in porazdelitve cvetočih dreves

divje češnje na izbranem območju pregledamo fotografije območja. V primerih, ko bi lahko bila istočasno na območju tudi drevesa drugih vrst z belimi cvetovi, ima prednost terenska preučitev potencialnih lokacij ploskev.

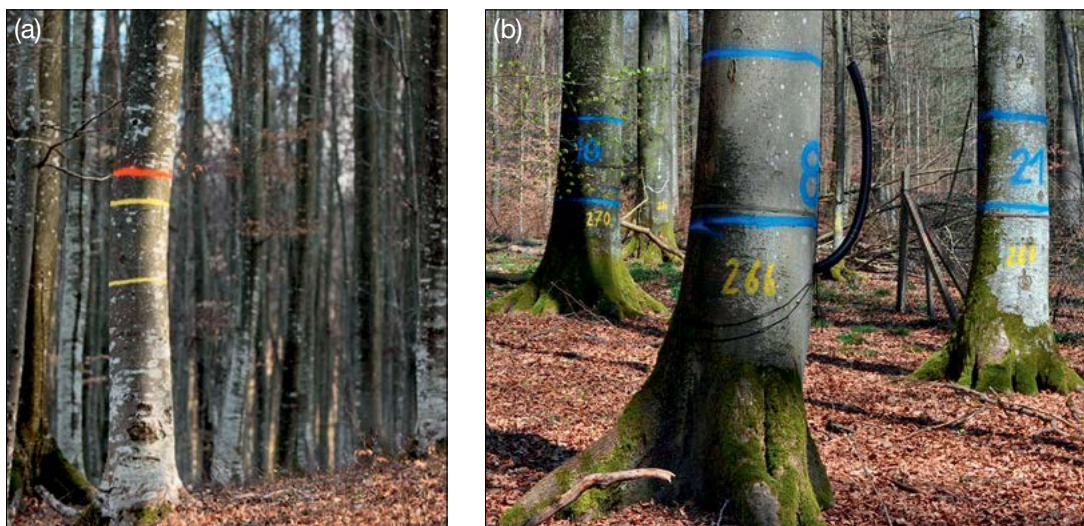
Vsa drevesa divje češnje v izbranem sestoju kartiramo z napravo GPS. Naključno izberemo petdeset (50) dreves z najmanjšo medsebojno razdaljo 30 metrov (Slika 3a). Pri postavljanju ploskve moramo ta vnaprej izbrana drevesa na terenu identificirati in označiti.

6.1.2 Postavitev ploskve na terenu

Drevesa, ki smo jih izbrali v pisarni, s pomočjo GPS v gozdnem sestoju poiščemo in označimo. Še enkrat preverimo, ali je razdalja med drevesi najmanj 30 m.

6.1.3 Označevanje dreves

Vsako izbrano drevo moramo označiti z ustrežno številko (od 1 do 50) in po možnosti z barvno črto okoli debla za večjo vidnost iz vseh smeri. (Slika 3b).



Slika 3: a) V izbranem sestoju z napravo GPS kartiramo vsa razmnoževalno aktivna drevesa divje češnje. Izmed vseh kartiranih dreves za genetski monitoring (GGM) naključno izberemo 50 dreves z medsebojno razdaljo vsaj 30 m. b) primer označevanja izbranih drevesih za gozdni genetski monitoring (na fotografiji je primer označevanja dreves na ploskvi za GGM navadne bukve).

6.2 Vzpostavitev podploskev za monitoring mladja

Naravna pomladitvena jedra iz zadnjega semenskega leta na terenu popišemo in zabeležimo njihove lokacije (koordinate GPS, številka drevesa, ki je najbližje pomladitvenega jedra). Zaradi dormance semena divje češnje se lahko mladje iz semenskega leta (leta masivnega obroda/semenitve) pojavi leto ali dve pozneje. Semena iz istega semenskega leta tako lahko vzkalijo v različnih letih. Med vsemi popisanimi pomladitvenimi jedri jih naključno izberemo 20 za vzpostavitev podploskev za monitoring mladja. Če je naravnih pomladitvenih jeder 20 ali manj, uporabimo vsa.

Znotraj vsakega pomladitvenega jedra postavimo podploskev za monitoring mladja s površino 1 m², ki jo označimo s kovinskimi palicami. Palice na vsakem oglišču podploskve zapičimo v tla, kolikor je mogoče globoko, da jih ne bi odstranile živali. Vrhove palic za boljšo vidnost pobarvamo.

6.3 Vzdrževanje ploskve

6.3.1 Splošno vzdrževanje

Označbe dreves in podploskev redno (vsaki dve leti) pregledujemo in po potrebi obnovimo.

6.3.2 Nadomeščanje dreves

Če opazovano drevo odmre ali se v okviru gospodarjenja poseka, ga moramo nadomestiti. Izberemo ustrezno drevo, ki je najbližje odmrlemu in izpolnjuje zahtevo po najmanjši oddaljenosti od najbližjega opazovanega drevesa 30 m. Nadomestno drevo se označi z naslednjo prosto številko, višjo od 50, tj. 51, 52, 53 itd., da ga lahko jasno ločimo od prvotno izbranih 50 dreves.

Če ima drevo poškodovano krošnjo, na primer zaradi vetroloma, žledoloma ali snegoloma, a lahko še obrodi, ga v monitoringu obdržimo. Vzrok poškodbe je treba zabeležiti, saj lahko poškodba vpliva na ugotovljene vrednosti verifikatorjev in dodatnih informacij. Če je škoda prehuda in obrod ni več pričakovan, moramo opazovano drevo nadomestiti.

7 Popis verifikatorjev in dodatnih informacij

Verifikatorje in dodatne informacije na ploskvi za monitoring redno popisujemo. Z verifikatorji spremljamo genetske lastnosti populacije ter njeno prilagajanje okoljskim spremembam in/ali upravljanju okolja, dodatne informacije pa popisujemo za lažje tolmačenje verifikatorjev.

Pri popisu verifikatorjev na višjih ravneh (standardna, napredna) moramo popisati tudi podatke za nižje ravni (osnovna, standardna). Pri popisu dodatnih informacij to ni potrebno.

Preglednica 1: Seznam verifikatorjev in dodatnih informacij s kratkim opisom in pogostostjo opazovanja za terensko popisovanje na ploskvah za genetski monitoring divje češnje.

Ime	Osnovna raven	Standardna raven	Napredna raven	
Mortaliteta/ preživetje	Odrasla drevesa: štetje preostalih označenih dreves vsako leto in po vsakem ekstremnem vremenskem pojavu/motnji	Enaka kot osnovna raven	Enaka kot osnovna raven	
	Naravno mladje: /	Štetje preostalega mladja na podploskvah za monitoring mladja, dvakrat na desetletje	Enaka kot standardna raven	
Verifikatorji	Cvetenje	Opazovanje na ravni posameznih dreves ob dveh obilnih cvetenjih na desetletje, najboljše v enakomernih časovnih razmikih*	Kot standardna raven, vendar se dodatno popisujejo tudi faze razvoja cvetov*	
	Obrod	Opazovanje na ravni posameznih dreves, v istem letu kot ocena cvetenja na standardni ravni (ne glede na jakost obroda)*	Štetje plodov, v istem letu kot ocena cvetenja na napredni ravni, ne glede na jakost obroda* Za vsak ocenjeni obrod na napredni ravni naberemo semena za laboratorijske analize	
	Obilnost mladja	Ocena na ravni sestoja, vsako leto	Štetje mladja na podploskvah za monitoring mladja v 2. in nato v 7., 12. in 17. letu po vsakem ocenjenem obrodu **	
Porazdelitev debelinskih razredov	/	Meritev vsakih 10 let	Enaka kot standardna raven	
Porazdelitev višinskih razredov	/	Meritev vsakih 10 let	Enaka kot standardna raven	
Dodatne informacije	Olistanje	/	Opazovanje na ravni posameznih dreves skladno s protokolom, vsakih 5 let	
	Staranje	/	Opazovanje na ravni posameznih dreves skladno s protokolom, vsakih 5 let	
	Usklajenost cvetenja	/	/	Opazovanje na ravni posameznih dreves, ob vsakem ocenjenem obilnem cvetenju
	Senescence	/	Individual tree level observation, every 5 years	Individual tree level observation, every year
	Flowering synchronisation	/	/	Individual tree level observation, during each assessed major flowering event

* Najbolje je, da vsako desetletje ocenimo vsaj en obilen obrod. Vendar pa vsakemu obilnemu cvetenju ne sledi nujno obilen obrod. Če ocenjenemu cvetenju ne sledi obilen obrod, moramo oceno cvetenja in obroda ponoviti ob naslednjem obilnem cvetenju, ne glede na to, koliko časa preteče med zaporednima obilnima cvetenjema. Obilno cvetenje in obrod prepoznamo z opazovanjem na osnovni ravni.

** Zaradi dormance semena divje češnje se lahko naravno mladje iz semenskega leta (leta masivnega obroda/semenitve) pojavi leto ali dve pozneje. Na novo vzkaljeno mladje (starosti do enega leta) v več letih lahko izvira iz istega semenskega leta.

7.1 Protokoli za popis verifikatorjev

7.1.1 Mortalitet/preživetje

Mortaliteta opisuje mortaliteto odraslih dreves. Nasprotni pojem, preživetje, pomeni drevesa, ki so od zadnje ocene še živa. Oba parametra se izražata v relativnih enotah, tj. deležu odmrlih oziroma preživelih dreves. Preživetje izračunamo s formulo $1 - \text{mortaliteta}$.

7.1.1.1 Odrasla drevesa: osnovna, standardna in napredna raven

Verifikator mortaliteta odraslih dreves. Ocenimo ga tako, da preštejemo preostala živa označena drevesa vsakih 10 let in po vsakem ekstremnem vremenskem pojavu/motnji. Mortalitet je razlika med začetnim številom označenih dreves in številom še živih dreves izmed prvotnih 50.

7.1.1.2 Naravno mladje: standardna in napredna raven

Mortaliteto mladja izračunamo iz ocen verifikatorja Obilnost mladja (razdelek 7.1.4). Mortalitet je razlika med začetnim številom mladja in številom še živega mladja ob naslednjem štetju. Za vsako ocenjevanje obilnosti mladje najprej preštejemo v letu kalitve in nato 5 let kasneje na standardni ravni, na napredni ravni pa še 10 in 15 let kasneje. Na standardni ravni za vsako ocenjevanje izračunamo mortaliteto po petih letih, na napredni ravni pa še po 10 in 15 letih. Obilnost mladja se ocenjuje dvakrat na desetletje, najbolje približno vsakih pet let.

7.1.2 Cvetenje

Ta verifikator opisuje prisotnost cvetenja (delež dreves) in njegovo jakost pri divji češnji. Običajno lahko cvetove divje češnje v srednji Evropi popisujemo od marca do maja. Cvetenje je zgodnejše, če je bila zima mila. Divja češnja običajno cveti vsako drugo leto.

7.1.2.1 Osnovna raven

Ta verifikator se popisuje vsako leto na ravni sestoja, vendar pa moramo zaradi manjšinske porazdelitve dreves divje češnje obiskati vseh 50 opazovanih dreves, da dobimo zanesljivo oceno povprečnega stanja v sestoji. Popis opravimo, ko je cvetenje v polnem zamahu. Povprečno stanje ocenimo po pregledu celotne ploskve za monitoring. Zabeležimo dva rezultata, enega za jakost cvetenja, izraženega kot povprečni delež krošnje s cvetovi, in drugega za delež cvetočih dreves v sestoji.

Šifra	Jakost cvetenja na ravni sestoja	Povprečni delež krošnje s cvetovi (%)
1	Brez cvetenja: na drevesih ni cvetov ali so cvetovi le ponekod.	0–10
2	Šibko cvetenje: na drevesih je nekaj cvetov.	> 10–30
3	Zmerno cvetenje: na drevesih je zmerno število cvetov.	> 30–60
4	Močno cvetenje: na drevesih je veliko število cvetov.	> 60–90
5	Masivno cvetenje: na drevesih je ogromno število cvetov.	> 90

Šifra	Delež dreves v sestoji z navedeno jakostjo cvetenja (%)
1	0–10
2	> 10–30
3	> 30–60
4	> 60–90
5	> 90

7.1.2.2 Standardna raven

Ta verifikator popišemo ob dveh obilnih cvetenjih na desetletje, najbolje v enakomernih časovnih razmikih. Popišemo ga na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves. Cvetenje je obilno, ko je na osnovni ravni ocenjeno kot močno ali masivno (šifra 4 ali 5) in je delež dreves z navedeno stopnjo jakosti cvetenja večji od 60 % (šifra 4 ali 5). Popis opravimo, ko je cvetenje v polnem zamahu. Za vsako drevo navedemo en rezultat.

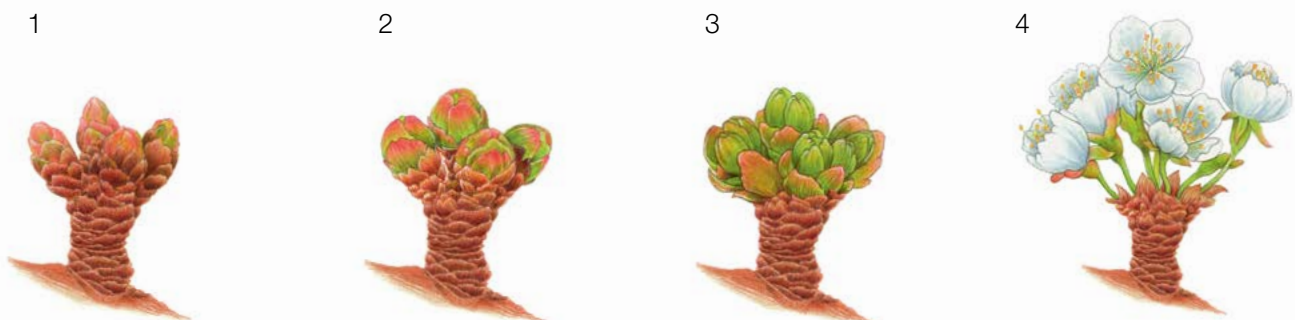
Šifra	Jakost cvetenja	Delež krošnje s cvetovi (%)
1	Brez cvetenja: na drevesu ni cvetov ali so cvetovi le ponekod.	0–10
2	Šibko cvetenje: na drevesu je nekaj cvetov.	> 10–30
3	Zmerno cvetenje: na drevesu je zmerno število cvetov.	> 30–60
4	Močno cvetenje: na drevesu je veliko število cvetov.	> 60–90
5	Masivno cvetenje: na drevesu je ogromno število cvetov.	> 90

7.1.2.3 Napredna raven

Ta verifikator popišemo ob dveh obilnih cvetenjih na desetletje, najbolje v enakomernih časovnih razmikih. Popišemo ga na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves. Cvetenje je obilno, ko je na osnovni ravni ocenjeno kot močno ali masivno (šifra 4 ali 5) in je delež dreves z navedeno stopnjo jakosti cvetenja večji od 60 % (šifra 4 ali 5). Povprečno sta potrebna dva obiska ploskve; prvi dovolj zgodaj, da opazujemo zgodnje faze cvetenja, in drugi, ko je cvetenje v polnem razmahu [8]. Za vsako drevo navedemo dva rezultata: faza cvetenja in delež krošnje s cvetovi. Faze cvetenja prikazuje Slika 4.

Šifra	Fenološke faze cvetov
1	Brsti niso aktivni, luske so rjave in zaprte
2	Brsti se povečujejo, luske se začnejo odmikati, tako da so vidni prvi robovi listov
3	Cvetni brst je odprt, cvetni listi so še zaprti, pecelj raste v dolžino
4	Cvetni listi se popolnoma odprejo, brazda je receptivna in prašniki sproščajo pelod

Šifra	Jakost cvetenja	Delež krošnje s cvetovi (%)
1	Brez cvetenja: na drevesu ni cvetov ali so cvetovi le ponekod.	0–10
2	Šibko cvetenje: na drevesu je nekaj cvetov.	> 10–30
3	Zmerno cvetenje: zmerno število cvetov.	> 30–60
4	Močno cvetenje: veliko število cvetov.	> 60–90
5	Masivno cvetenje: ogromno število cvetov.	> 90



Slika 4: Slikovni vodnik za opisovanje faz cvetenja na napredni ravni verifikatorja Cvetenje.

7.1.3 Obrod

Ta verifikator opisuje prisotnost plodov in njihovo obilnost. Podatke za ta verifikator zbiramo v času obroda, v srednji Evropi od pozne pomladi do sredine ali konca poletja. Divja češnja običajno obrodi vsako drugo leto.

7.1.3.1 Osnovna raven

Ta verifikator se popisuje vsako leto na ravni sestoja, vendar pa moramo zaradi manjšinske porazdelitve dreves divje češnje obiskati vseh 50 opazovanih dreves, da dobimo zanesljivo oceno povprečnega stanja v sestoji. Zabeležimo dva rezultata, enega za jakost obroda in drugega za delež dreves v sestoji, ki so obrodila.

Šifra	Jakost obroda na ravni sestoja	Povprečni delež krošnje s plodovi (%)
1	Brez obroda: na drevesih ni plodov ali so plodovi le ponekod.	0–10
2	Šibek obrod: na drevesih je nekaj plodov.	> 10–30
3	Zmeren obrod: na drevesih je zmerna količina plodov.	> 30–60
4	Močen obrod: na drevesih je veliko plodov.	> 60–90
5	Masiven obrod: na drevesih je ogromno plodov.	> 90

Šifra	Delež dreves v sestoji z navedeno jakostjo obroda (%)
1	0–10
2	> 10–30
3	> 30–60
4	> 60–90
5	> 90

7.1.3.2 Standardna raven

Ta verifikator popišemo v istih letih kot oceno cvetenja na standardni ravni (ne glede na jakost obroda). Popišemo ga na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves. Popis opravimo, preden plodovi začnejo odpadati ali jih pojedo ptice. Za vsako drevo navedemo en rezultat.

Najbolje je, da po opaženih obilnih cvetenjih zajamemo vsaj en obilen obrod na desetletje. Vendar pa vsakemu obilnemu cvetenju ne sledi nujno obilen obrod. Če ocenjenemu obilnemu cvetenju ne sledi obilen obrod, moramo oceno cvetenja in obroda ponoviti ob naslednjem obilnem cvetenju, ne glede na to, koliko časa preteče med zaporednima obilnima cvetenjema. Obilen obrod prepoznamo z opazovanjem na osnovni ravni. Obrod je obilen, ko je na osnovni ravni ocenjen kot močen ali masiven (šifra 4 ali 5) in je delež dreves z navedeno stopnjo jakosti obroda večji od 60 % (šifra 4 ali 5).

Šifra	Jakost obroda	Delež krošnje s plodovi (%)
1	Brez obroda: na drevesu ni plodov ali so plodovi le ponekod.	0–10
2	Šibek obrod: na drevesu je nekaj plodov.	> 10–30
3	Zmeren obrod: na drevesu je zmerna količina plodov.	> 30–60
4	Močen obrod: na drevesu je veliko plodov.	> 60–90
5	Masiven obrod: na drevesu je ogromno plodov.	> 90

7.1.3.3 Napredna raven

Ta verifikator popišemo na ravni posameznih dreves divje češnje za vseh 50 opazovanih dreves, v istih letih kot oceno cvetenja na napredni ravni, ne glede na jakost obroda. Popis opravimo, preden plodovi začnejo odpadati. Za vsako drevo navedemo en rezultat in zabeležimo kateri del krošnje smo opazovali. Obenem naberemo seme za testiranje semena in genetsko analizo za verifikatorje in dodatne informacije na napredni ravni.

Najbolje je, da po opaženih obilnih cvetenjih zajamemo vsaj en obilen obrod na desetletje. Vendar pa vsakemu obilnemu cvetenju ne sledi nujno obilen obrod. Če ocenjenemu cvetenju ne sledi obilen obrod, moramo oceno cvetenja in obroda ponoviti ob naslednjem obilnem cvetenju, ne glede na to, koliko časa preteče med zaporednima obilnima cvetenjema. Obilen obrod prepoznamo z opazovanjem na osnovni ravni. Obrod je obilen, ko je na osnovni ravni ocenjen kot močen ali masiven (šifra 4 ali 5) in je delež dreves z navedeno stopnjo jakosti obroda večji od 60 % (šifra 4 ali 5).

Verifikator popišemo tako, da skozi daljnogled preštejemo plodove. Uporabimo povprečni rezultat treh zaporednih štetij. Rezultat vsakega štetja je število plodov, ki jih opazovalec lahko prešteje v 30 sekundah. Pri vseh drevesih moramo preučevati isti del krošnje. Ko izberemo del krošnje, ki ga bomo opazovali, moramo ob vsakem naslednjem spremljanju tega verifikatorja izbrati isti del krošnje. Zgornja tretjina krošnje je za štetje ustrežnejša od spodnjega in srednjega dela.

Zabeležimo dve vrednosti, število plodov in opazovani del krošnje.

Število plodov, prešteti v 30 sekundah (povprečje 3 štetij)

X

Šifra Opazovani del krošnje

1 Spodnji

2 Srednji

3 Zgornji

7.1.4 Obilnost mladja

Ta verifikator opisuje prisotnost in številčnost mladja na ploskvi za monitoring. Dormanca semena divje češnje lahko traja eno ali dve zimi, zato lahko mladje požene prvo ali tudi šele drugo pomlad po obrodu.

7.1.4.1 Osnovna raven

Ta verifikator popišemo na ravni sestoja (preglejte območja z obstoječimi in cvetočimi divjimi češnjami ter čistine, primerne za naselitev novega mladja), jeseni vsako leto. Za oceno uporabimo strokovno mnenje. Zabeležimo dve vrednosti, eno za novo mladje (mladje, ki je vzkalilo v istem letu kot se opravlja opazovanje) in eno za starejše naravno mladje (mladje, ki je starejše od enega leta). Ker je ključni dejavnik za naselitev novega naravnega mladja divje češnje svetloba, se osredotočimo na gozdne vrzeli in čistine ali gozdne robove. Ker je naravnega mladja divje češnje običajno malo, uporabljamo samo dve stopnji obilnosti.

Šifra Opis: novo mladje (mladje starosti do enega leta)

1a Na ploskvi ni novega mladja ali ga je zelo malo

2a Na ploskvi je zadostna količina novega mladja

Šifra Opis: starejše mladje (mladje starejše od enega leta)

1b Na ploskvi ni starejšega mladja ali ga je zelo malo

2b Na ploskvi je zadostna količina starejšega mladja

7.1.4.2 Standardna raven

Dormanca semena divje češnje lahko traja eno ali dve zimi, zato lahko mladje požene prvo ali tudi šele drugo pomlad po obrodu. Čas postavitve podploskev z mladjem in začetek štetja mladja je treba prilagoditi dormanci semena na dotični lokaciji. Ta verifikator popišemo tako, da preštejemo mladje ustrezne starosti najprej dve leti in nato še sedem let po vsakem ocenjenem obilnem obrodu (časovna točka 0). V drugem letu po obilnem obrodu preštejemo mladje starosti do enega leta, v 7. letu pa 5-letno mladje. Po naslednjem ocenjenem obilnem obrodu, ki naj bo približno pet let po prejšnjem, moramo vzpostaviti novih dvajset (20) podploskev za monitoring mladja divje češnje.

Rezultat štetja mladja na podploskvi

X

Vzpostavitev podploskev je opisana v razdelku 6.2, Vzpostavitev podploskev za monitoring mladja.

7.1.4.3 Napredna raven

Dormanca semena divje češnje lahko traja eno ali dve zimi, zato lahko prvo mladje požene prvo ali tudi šele drugo pomlad po obrodu. Čas postavitve podploskev z mladjem in začetek štetja mladja je treba prilagoditi dormanci semena na dotični lokaciji. Ta verifikator popišemo tako, da preštejemo mladje ustrezne starosti 2., 7., 12. in 17. leto po ocenjenem obilnem obrodu (časovna točka 0). V drugem letu po obilnem obrodu preštejemo mladje starosti do enega leta, v 7. letu 5-letno mladje, itn. Po naslednjem ocenjenem obilnem obrodu moramo vzpostaviti novih dvajset (20) podploskev za monitoring mladja divje češnje. Kadar je obilen obrod vsako leto ali vsako drugo leto, mora med zaporedno ocenjenima obilnima obrodoma preteči približno pet let.

Preglednica 2: Časovni potek ocenjevanja obilnosti mladja. V spodnjem primeru se prvi ocenjeni obrod zgodi v 2. letu monitoringa; glede na eno do dve zimi trajajočo dormanco semena divje češnje se tako v 4. letu monitoringa vzpostavi 20 podploskev za monitoring mladja. Naslednja ocena obroda se opravi v 8. letu monitoringa. Glede na dormanco semena divje češnje se v 10. letu vzpostavi novih 20 podploskev za monitoring mladja. Po vsakem ocenjenem obrodu se vzpostavi novih dvajset podploskev z mladjem. Monitoring obilnosti mladja se za vsako skupino 20 podploskev opravi vsakih pet let. Obrodi, iz katerih je zrastle ocenjevano mladje, in časovni potek ocenjevalnih dejavnosti so obarvani z enako barvo. Po zadnjem štetju mladja se monitoring obilnosti mladja na ustrezni skupini podploskev ustavi in podploskve se ukinejo. S – standardna raven; N – napredna raven.

Leto monitoringa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Obrod		•			•	•		•		•		•		•		•	•		•		•		•		•
Ocena mladja za 1. ocenjeni obrod		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Vzpostavitev podploskev z mladjem				SN																					
Štetje obilnosti mladja				SN				SN					N					N							
Ocena mladja za 2. ocenjeni obrod								0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Vzpostavitev podploskev z mladjem										SN															
Štetje obilnosti mladja										SN				SN					N						N

Vzpostavitev podploskev je opisana v razdelku 6.2, Vzpostavitev podploskev za monitoring mladja, štetje pa v razdelku 7.1.4.2, Standardna raven.

7.2 Protokoli za popis dodatnih informacij

7.2.1 Porazdelitev debelinskih razredov

7.2.1.1 Standardna in napredna raven

Prsni premer popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves vsakih 10 let. Prsni premer je premer debla na višini 1,30 m, tj. približno v višini prsi odraslega človeka. Če ima drevo več kot eno deblo, izmerimo vsa in ocenimo povprečno vrednost (vendar se skušamo izogniti drevesom s številnimi majhnimi debli). Če je drevo večdebello, to zabeležimo v opombe. Če je drevo nagnjeno, prsni premer izmerimo pravokotno na drevesno deblo. Prsni premer lahko izmerimo na dva načina:

- 1) s premerko: v tem primeru izmerimo dva premera, pravokotno eden na drugega, in ocenimo povprečje;
- 2) z meritvijo obsega drevesa, iz katerega izračunamo premer (delimo ga s številom π , $\sim 3,14$, ali uporabimo pi-meter).

Prsni premer zabeležimo v cm. Pri vsakem naslednjem merjenju moramo uporabiti isto merilno metodo.

7.2.2 Porazdelitev višinskih razredov

7.2.2.1 Standardna in napredna raven

Višino popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves vsakih 10 let. Višino izmerimo od tal do najvišjega dela krošnje, najbolje s klinometrom ali višinomerom (Vertex). Višino beležimo v metrih, na eno decimalno mesto natančno.

7.2.3 Olistanje

Olistanje opisuje razvoj mladih listov. Pri divji češnji se začne skupaj s cvetenjem. Popis te dodatne informacije opravimo samo na standardni in napredni ravni. Podatke za olistanje v srednji Evropi popišemo med marcem in majem. Olistanje je zgodnejše, če je bila zima mila.

7.2.3.1 Standardna raven

Na standardni ravni olistanje popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves, vsakih pet let. Zanimata nas začetek (2. faza) in konec olistanja (4. faza) [8]. Opazovanje se preneha, ko vsa drevesa dosežejo 4. fazo. Običajno je potrebnih šest obiskov. Za vsako drevo zabeležimo dve oceni: faza olistanja in delež krošnje z navedeno fazo olistanja. Faze olistanja prikazuje Slika 5.

Šifra Faza olistanja	
1	Brsti so nabrekli, nekatere listne luske se razmikajo, tako da so vidni prvi robovi listov
2	Lističi dosežejo prejšnjo velikost brstov in se začnejo razmikati
3	Listi rastejo v dolžino, a so še zloženi
4	Listi so povsem razgrnjeni; površina listov je očitno povečana; pojavijo se peclji, tako da se listi obračajo in visijo.
Šifra Delež krošnje z navedeno fazo olistanja (%)	
1	> 0–33
2	> 33–66
3	> 66–99
4	100



Slika 5: Slikovni vodnik za opisovanje olistanja (razvoja listov) na osnovni, standardni in napredni ravni za dodatno informacijo Olistanje.

7.2.3.2 Napredna raven

Na napredni ravni olistanje popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves, vsako leto. Vrednosti (faza olistanja in delež krošnje z navedeno fazo olistanja) so v razdelku 7.2.3.1, Standardna raven.

7.2.4 Senescenca

Senescenca opisuje proces senescence listov. Popis te dodatne informacije opravimo samo na standardni in napredni ravni.

7.2.4.1 Standardna raven

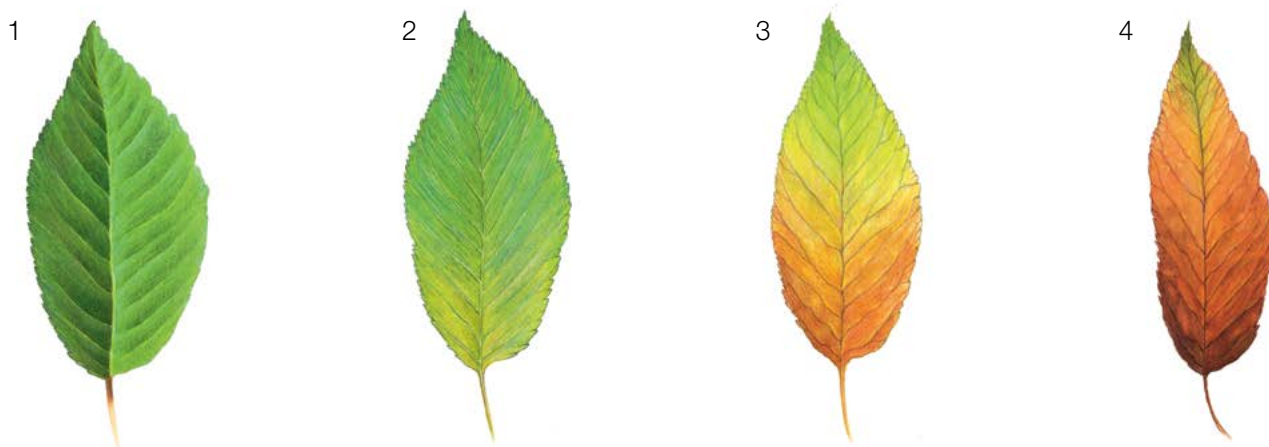
Na standardni ravni senescenco popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves vsakih pet let. Zanima nas 3. faza, ko so listi rumeni in v njih več ne poteka fotosinteza. Opazovanje se preneha, ko vsa drevesa dosežejo 3. fazo. Običajno sta potrebna dva (2) obiska ploskve. Za vsako drevo zabeležimo dve oceni: faza senescence in delež krošnje z navedeno fazo senescence. Faze senescence prikazuje Slika 6.

Šifra Faza senescence

1	Listi so zeleni
2	Listi so zelene barve, ki se spreminja v rumeno (zelenkasto rumena)
3	Listi so rumene barve, ki se spreminja v rjavo (rjavkasta)
4	Listi so rjavi/odpadli

Šifra Delež krošnje z navedeno fazo senescence (%)

1	> 0–33
2	> 33–66
3	> 66–99
4	100



Slika 6: Slikovni vodnik za opisovanje obarvanosti listja na standardni in napredni ravni za dodatno informacijo Senescenca.

7.2.4.2 Napredna raven

Na napredni ravni senescenco popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves, vsako leto. Vrednosti (faza senescence in delež krošnje z navedeno fazo senescence) so v razdelku 7.2.4.1, Standardna raven.

7.2.5 Usklajenost cvetenja

7.2.5.1 Napredna raven

Usklajenost cvetenja spremljamo samo na napredni ravni na podlagi podatkov, zbranih za verifikator Cvetenje na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves, ob vsakem ocenjenem obilnem cvetenju. S to informacijo ugotavljamo, ali je cvetenje v opazovanem sestoju časovno usklajeno.

Za vzpostavitev ploskve uporabite obrazec: »GGM - Opis ploskve«

Za popis verifikatorjev uporabite obrazec: »GGM - Terenski verifikatorji«

Za popis dodatnih informacij uporabite obrazec: »GGM - Terenske dodatne informacije«

8. Viri

1. EUFORGEN (2009) Distribution map of Wild cherry (*Prunus avium* L.). <http://www.euforgen.org/species/prunus-avium/>. Accessed 25 August 2020
2. Ballian D (2000) Početna istraživanja varijabilnosti morfoloških svojstava sjemena divlje trešnje (*Prunus avium* L.). Šum list 5-6:271–278
3. Ballian D (2002) Variability of characteristics of the wild cherry blossom (*Prunus avium* L.) in the region of central Bosnia, Annales forestales 25/2:1–19
4. Ballian D, Bogunić F (2006) Preliminary results of investigation of morphological traits variation of wild cherry (*Prunus avium* L.) in Bosnia and Herzegovina. International Scientific Conference In occasion of 60 year of operation of Institute of Forestry, Belgrade, Serbia, Donji Milanovac 08.-10.11. 2006. PROCEEDINGS pp. 47–51
5. Ballian D, Bogunić F, Čabaravdić A, Pekeč S, Franjić J (2012) Population differentiation in the wild cherry (*Prunus avium* L.) in Bosnia and Herzegovina. Period Biol 114(1):43–54

6. Ballian D, Mujagić-Pašić A (2013) Morphological variability of the fruit and seed of wild cherry (*Prunus avium* L.) in a part of its natural distribution in Bosnia and Herzegovina. *Biologica Nyssana* 4(1-2):15-17
7. Buiteveld J (2012) *Prunus avium* L. In: Fussi B, Belle C, Konnert M, Blanc-Jolivet C, Liesebach M, Buiteveld J, Piotti A, Vendramin GG, Wagner S, Petit RJ, Jahn D, Heinze B (ed) Project: Designing Trees for the Future. D7.1 – Report on review of available and tested methods for identification and on new marker development. <http://www.trees4future.eu/publications/deliverables-2.html#wp2> Accessed 09 September 2020
8. Ducci F, De Cuyper B, Pâques LE, Proietti R, Wolf H (2012) Reference protocols for assessment of trait and reference genotypes to be used as standards in international research projects. Ed. CRA SEL - Arezzo, p 82.
9. Ducci F, De Cuyper B, De Rogatis A, Dufour J, Santi F (2013) Wild cherry breeding (*Prunus avium* L.). In: Pâques LE (ed) Forest Tree Breeding in Europe. Springer, Dordrecht, pp 463-511. DOI: 10.1007/978-94-007-6146-9
10. FUTMON project. (2009) FUTMON FIELD PROTOCOL PHENOLOGY (D1). <http://www.futmon.org/futmon-field-protocols.html>. Accessed 12 September 2016
11. Ganopoulos I, Aravanopoulos FA, Argiriou A, Kalivas A & A Tsaftaris (2012) Genome and population dynamics under selection and neutrality: an example of S-allele diversity in wild cherry (*Prunus avium* L.). *Tree Genet. Genomes* 8(6):1181–1190. <https://doi.org/10.1007/s11295-012-0504-9>
12. Hedhly A, Wünsch A, Kartar Ö, Herrero M, Hormaza JI (2016) Paternal-specific S-allele transmission in sweet cherry (*Prunus avium* L.): the potential for sexual selection. *J Evol Biol* 29(3):490–501. <https://doi.org/10.1111/jeb.12790>
13. Hölftken AM, Gregorious HR (2006) Detecting local establishment strategies of wild cherry (*Prunus avium* L.). *BMC Ecol* 6(1):13. <https://doi.org/10.1186/1472-6785-6-13>
14. Olden EJ, Nybom N (1968) On the origin of *Prunus cerasus* L. *Hereditas* 59(2-3):327–345. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1968.tb02181.x>
15. Radičević S, Marić S, Cerović R (2015) S-allele Constitution and Flowering Time Synchronization – Preconditions for Effective Fertilization in Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) Orchards. *Romanian Biotechnological Letters* 20(6):10997–11006
16. Russell K (2003) EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for wild cherry (*Prunus avium*). International Plant Genetic Resources Institute, Rome
17. Schuster M, Früh S (2005) Bestimmung der S-Allele in Brennkirschensorten (*Prunus avium* L.). *Erwerbs-Obstbau* 47:40–45. DOI: 10.1007/s10341-004-0051-0
18. Tavaud M, Zanetto A, David JL, Laigret F, Dirlwanger E (2004) Genetic relationships between diploid and allotetraploid cherry species (*Prunus avium*, *Prunus* × *gondouinii* and *Prunus cerasus*). *Heredity* 93(6):631–638. DOI: 10.1038/sj.hdy.6800589
19. Welk E, de Rigo D, Caudullo G (2016) *Prunus avium* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: San-Miguel-Ayanz J, de Rigo D, Caudullo G, Houston Durrant T, Mauri A (Eds.) European Atlas of Forest Tree Species. Publ. Off. EU, Luxembourg, pp e01491d+. https://ies-ows.jrc.ec.europa.eu/efdac/download/Atlas/pdf/Prunus_avium.pdf. Accessed 25 August 2020

Za veljavno znanstveno nomenklaturu vrst so bili uporabljeni sledeči viri:

- a. CABI (2020) Invasive Species Compendium. CAB International, Wallingford, UK. www.cabi.org/isc. Pridobljeno 15 december 2020
- b. EPPO (2020) EPPO Global Database (available online). <https://gd.eppo.int>. Pridobljeno 15 december 2020
- c. GBIF (2020) Global Biodiversity Information Facility. <https://www.gbif.org> Pridobljeno 15 december 2020
- d. IPNI (2020) International Plant Names Index. The Royal Botanic Gardens, Kew, Harvard University Herbaria & Libraries & Australian National Botanic Gardens. <http://www.ipni.org>, Pridobljeno 10 december 2020
- e. National Center for Biotechnology Information (NCBI) (1998) National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, Bethesda (MD). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Pridobljeno 15 december 2020
- f. Stevens PF (2001) Angiosperm Phylogeny Website, Version 14. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Pridobljeno 15 december 2020
- g. The Plant List (2013) Version 1.1. <http://www.theplantlist.org/>. Pridobljeno 12 december 2020
- h. Tropicos.org (2020) Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org>. Pridobljeno 15 december 2020
- i. WFO (2020) World Flora Online. <http://www.worldfloraonline.org>. Pridobljeno 15 december 2020

Smernice za gozdni genetski monitoring

9.2.7 **doba** **(*Quercus robur* L.)** **in** **gradna** **(*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.)**

Kristina SEVER¹, Andrej BREZNIKAR¹, Marko BAJC², Phil ARAVANOPOULOS³,
Rok DAMJANIĆ², Barbara FUSSI⁴, Darius KAVALIAUSKAS⁴,
Marjana WESTERGREN², Hojka KRAIGHER²

Ilustracije: Eva MARGON



Navedba: Sever in sod. (2020) Smernice za gozdni genetski monitoring doba (*Quercus robur* L.) in gradna (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.). V: Bajc in sod. (ur.) Priručnik za gozdni genetski monitoring. Gozdarski inštitut Slovenije: Založba Silva Slovenica, Ljubljana, str. 271-290. <http://dx.doi.org/10.20315/SFS.168>

Povezane ustanove:

1. Zavod za gozdove Slovenije (ZGS), Slovenija
2. Gozdarski inštitut Slovenije (GIS), Slovenija
3. Aristotelova univerza v Solunu (AUTh), Grčija
4. Bavarski urad za gozdno genetiko (AWG), Nemčija

1 Povzetek

Dob (*Quercus robur* L.) in graden (*Q. petraea* (Matt.) Liebl.) sta najpomembnejša med 13 evropskimi vrstami hrastov. Z ekonomskega in ekološkega vidika sta med pomembnejšimi vrstami v listopadnih gozdovih Evrope. Obe vrsti sta v Evropi zelo razširjeni. Uspevata od severne Španije do južne Skandinavije in od Irske do vzhodne Evrope. Poleg tega sta si v tesnem sorodstvu. Lahko tvorita mešane sestoje, med seboj tekmujeta ter se naravno križata, prav tako pa se križata z ostalimi hrasti [2, 3, 5, 8].

Hrasti so ena najbolj raznolikih drevesnih vrst v gozdovih. Visoka stopnja raznolikosti je najverjetneje posledica velikih populacij, prekrivanja ekoloških niš, pretoka genov na dolge razdalje in medvrstne hibridizacije. Vpliv človeka na populacije hrastov je zelo velik, saj se z večino hrastovih gozdov intenzivno gospodari. Pragozdovi, kot je Beloveška pušča (Białowieża) na Poljskem in v Belorusiji, so zelo redki. Genski viri hrastov so ogroženi zaradi izgube naravnih rastišč in omejenosti semenskih virov, pa tudi zaradi posledic dolgoletnega onesnaževanja zraka in podnebnih sprememb [3].

V teh smernicah sta na kratko opisana dob in graden, njun razmnoževalni sistem, ekologija, pomen, razširjenost in nevarnosti, ki ju ogrožajo. Smernice vsebujejo tudi napotke za vzpostavitev sistema za genetski monitoring kompleksa *Quercus robur/petraea*, za popis vseh terenskih verifikatorjev ter dodatnih informacij.

2 Opis vrst

Dob (*Quercus robur*) in graden (*Q. petraea*) sta visoka listavca, ki dosežeta višino 30–40 m in živita 800 let ali več. Tako kot drugi hrasti sta morfološko zelo variabilna in se lahko naravno križata. S križanjem nastanejo osebki, ki imajo vmesne lastnosti ali pa večinoma lastnosti ene vrste, zato jih zgolj na podlagi opazovanja morfoloških znakov težko nedvoumno opredelimo [1, 2, 3, 5].

Dob in graden sta razširjena v večini Evrope. Njuni območji razširjenosti se pogosto prekrivata. Naravno se pojavljata od Irske in severozahodnih predelov Pirenejskega polotoka na zahodu do vzhodne Evrope na vzhodu in do juga Skandinavije na severu. Na jugu je meja razširjenosti težje določiti, saj se vrsti lahko mešata in naravno križata z drugimi sredozemskimi hrasti, na primer z vrstama *Quercus pubescens* Willd. in *Quercus frainetto* Ten., ter jim konkurirata, čeprav v razmeroma majhnem obsegu [3, 5]. Dob je bolj razširjen na vzhodu in sega do Urala, graden pa do Ukrajine.

Dob in graden se najbolj razlikujeta po značilnostih listov, plodov in debla.

Deblo doba je običajno kratko in izgine v krošnji, pogosto se razvije v nepravilno razporejene glavne veje z vijugastimi manjšimi vejami (Slika 1). Pri gradnu je deblo običajno daljše, z vejami ki postopoma postajajo vse tanjše (Slika 2) [1, 2, 3, 5]. Skorja je pri obeh vrstah rjava siva, razpokana, z dolgimi pravokotnimi ploščicami, ki so pri dobu debelejša, pri gradnu pa se pogosto luščijo.

Listi so enostavni, jajčasti in podolgovati, z nepravilnimi zajedami ter kratkim pecljem (2–7 mm) pri dobu in dolgim pecljem (13–25 mm) pri gradnu (Slika 3) [1, 2, 3, 5].

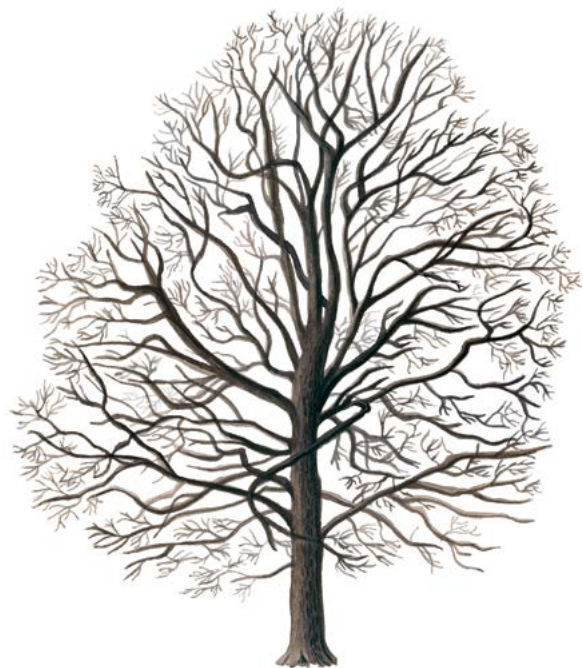
Plod je želod, ki pogosto v parih sedi v luskastih skledicah, pri dobu na koncu dolgih pecljev, pri gradnu pa so peclji kratki ali jih sploh ni. Želodi so po velikosti in obliki zelo raznoliki, a so običajno pri dobu manjši in bolj okrogli z olivno zelenimi vzdolžnimi progami, ki so vidne, ko je želod še svež [1, 2, 3, 5].

Obe vrsti težko opredelimo le z vizualnim opazovanjem posameznih znakov. Molekularne metode so najzanesljivejše orodje za razlikovanje med vrstama. Na terenu so za določitev vrste in opredelitev stopnje hibridizacije med dobom in gradnom najbolj uporabne značilnosti listov in plodov. Glavno merilo za taksonomsko določanje križancev doba in gradna je vmesna vrednost več morfoloških znakov glede na tipične lastnosti za dob in graden. Najboljšo osnovo za razlikovanje doba in gradna nudijo dolžina listnega peclja (graden – dolg, dob – kratek), dolžina peclja želoda (graden – kratek, dob – dolg), listne zajede (graden – ne tako globoke,

dob – globoke), listne žile v zajedah (graden – jih ni, dob – zelo pogoste), oblika listnega dna (graden – klinasta ali z neizrazitimi ušesci, dob – zelo izrazita ušesca), dlakavost listov (graden – zvezdaste prilegle dlačice na spodnji strani lista, dob – brez dlačic) [1, 2, 3, 5].



Slika 1: Habitus doba (*Quercus robur*) poleti in pozimi.



Slika 2: Habitus gradna (*Q. petraea*) poleti in pozimi.



Slika 3: Listi in plodovi doba (*Quercus robur*) (levo) in gradna (*Q. petraea*) (desno).

3 Razmnoževanje

Oba hrasta sta enodomna in vetrocvetna, z ločenimi moškimi in ženskimi cvetovi, ki se razvijajo v dveh vrstah socvetij [1, 2, 3, 5, 6].

Moški cvetovi so združeni v mačice, dolge približno 5 cm. Razvijajo se v zalistju notranjih brstnih lusk ali prvih listov. Obe vrsti cvetita pozno spomladi (konec aprila in maja), hkrati z olistanjem (dob dva tedna prej kot graden). Ob ugodnih vremenskih razmerah se pri posameznem drevesu rast mačic konča 1–2 tedna po odpiranju brstov, do opraitve pa pride v 2–4 dneh [1, 2, 3, 5, 6].

Ženski cvetovi zrastejo na terminalnih poganjkih takoj za prvimi listi (in moškimi mačicami). So krogličasti in veliki le 1 mm, zato so zelo neopazni in jih težko preučujemo. Ko so receptivni, postanejo rdečkasti in lepljivi. Pri dobu rastejo posamično ali v majhnih skupinah na dolgih pecljih, medtem ko so pri gradnu sedeči in rastejo v skupinah po 2–5 [1, 2, 3, 5, 6].

Alogamijo (medsebojno opráševanje) podpira več mehanizmov, na primer različen čas moškega in ženskega cvetenja na istem drevesu, fiziološka prednost tujega peloda na brazdi pestiča, dejstvo, da vsako semensko leto v sestoji ne cvetijo in semenijo ista razmnoževalno aktivna drevesa, itd. [3, 6].

Želod dozori približno v treh mesecih po oploditvi in nato odpade. Pri dobu želod dozori konec septembra ali na začetku oktobra, kar je prej kot pri gradnu, pri katerem dozori oktobra [1, 2, 3, 5]. Drevesa običajno prvič obrodijo pri starosti od 40 do 100 let, v panjevskih sestojih pri 20 letih. Semensko leto je običajno vsakih 5 do 7 let in se razlikuje glede na posamezno drevo, populacijo, regijo, leto in gostoto dreves (nizka gostota spodbuja zgodnejšo razmnoževalno zrelost) [3].

Hrasti se večinoma razmnožujejo s semenom. Za raznos semena so pomembni sesalci in ptice, zlasti šoja (*Garrulus glandarius* L.), ki jo lahko štejemo za glavno raznašalko, saj lahko seme raznese do 5 km daleč. Pri juvenilnih osebkih je lahko prisotna sposobnost za odganjanje iz panjev. Čeprav se ta s starostjo debla zmanjšuje, hrastom omogoča ohranjanje populacij tudi ob odsotnosti plodov. V primerjavi z raznosom peloda in želoda vegetativno razmnoževanje ni pomembna komponenta pretoka genov. Vseeno pa lahko prispeva k ohranjanju genetske variabilnosti v populaciji [2, 3, 4, 5, 6].

4 Okolje

Dob in graden na številnih rastiščih raste skupaj in sta med glavnimi gradniki mešanih listnatih gozdov zmernege pasu. Imata več skupnih značilnosti. Običajno so to vitalna drevesa s širokim ekološkim razponom, čeprav raje rastejo na plodnih in vlažnih tleh. Hrasti lahko prevladujejo v nižinskih do srednje visoko ležečih gozdovih. Obe vrsti imata lahko pionirski značaj, zaradi poznega olistanja ju le redko prizadene spomladanska pozeba, imata pa tudi dobro sposobnost odganjanja, zato dajeta sečnja na panj in obrezovanje na glavo dobre rezultate. Zaradi močne in globoke glavne korenine (ki je pri gradnu bolj razvita) so drevesa strukturno stabilna in odporna proti močnim vetrovom, prenesejo pa tudi zmerno sušo, saj dosežejo vodo v globljih plasteh. Vendar pa se v pogojih, ki so daleč od optimalnih, pokažejo ekološke razlike. Dob pogosteje raste na težkih tleh v bolj celinskem podnebju, na mokrih nižinskih območjih ter vlažnih predelih ob rekah in potokih. Dobro prenese tudi občasno poplavljanje. Gradn bolj kot dob prenese sušo in revna tla, bolj občutljiv pa je na težka tla. Raje raste v bolj atlantskem podnebju, na lahkih in dobro odcednih, pogosto skalnih tleh, v splošnem na pobočjih in vrhovih hribov. Bolje uspeva na bolj kisljih tleh. Obe vrsti sta svetloлюбni (dob bolj kot gradn) in skozi zastor krošenj prepuščata veliko svetlobe, kar omogoča rast številnih drevesnih vrst v spodnjem sloju in bogatitev vrstne pestrosti. V naravnih razmerah redko tvorita čiste sestoje. Na ravninah, planotah in hribovskih je dob pionirska vrsta, gradn pa vrsta poznega sukcesijskega stadija. Gradn lahko doseže klimaks, če so poletja suha. V dolinah in poplavnih ravninah je dob vrsta pozne sukcesije, ki doseže klimaks skupaj z gorskim javorjem (*Acer pseudoplatanus* L.), poljskim javorjem (*Acer campestre* L.), jesenom (*Fraxinus* spp.) in brestom (*Ulmus* spp.) [2, 3, 5].

5 Ogroženost

Hrastove populacije ogrožajo podnebne spremembe, fragmentiranost habitatov (zlasti dob v nižinah), spremembe režima podtalnice in čezmerno izkoriščanje odraslih sestojev [2].

Največja nevarnost za genetsko raznolikost je vnos eksotičnih genotipov s plantaž. Populacije, ki rastejo v ekstremnih razmerah, lahko še posebej hitro izginejo, saj je število osebkov majhno, habitatni nestabilni, vpliv človeka pa je pogosto izredno velik [3].

Zaradi porušenega razmerja razvojnih faz, preštevne rastlinojede divjadi ali sprememb režima podtalnice je naravna obnova lahko otežena. Mladje pogosto odmre v nekaj letih po kalitvi [1, 2].

Resna grožnja so tudi patogeni in škodljivi organizmi. Hrastova pepelovka (*Erysiphe alphitoides* (Griffon & Maubl.) U. Braun & S. Takam) velja za najpogostejšega patogena, ki napada hrast. Akutno propadanje hrastov je nov sindrom, ki največkrat prizadene ravno dob in gradn. Zanj so značilni zmanjšanje gostote krošnje, pojav ran (»krvavitev«) s temnim izcedkom na deblu in v večini primerov prisotnost dvopikastega krasnika (*Agilus biguttatus* Fabricius) [3].

Pogost pojav je tudi odpadanje prvih listov. Povzročajo ga gosenice več vrst metuljev, npr. zelenega hrastovega zavijača (*Tortrix viridana* L.), navadnega gobarja (*Lymantria dispar* L.), malega zmrzlikarja (*Operophtera brumata* L.) in hrastovega sprevodnega prelca (*Thaumetopoea processionea* L.). Pridelek želoda lahko poškoduje tudi nagubana hrastova šiškarica (*Andricus quercuscalicis* Burgsdorf) [3].

6 Vzpostavitev in vzdrževanje ploskve

Hrast tvori skoraj čiste ali mešane sestoje s številnimi nižinskimi drevesnimi vrstami, zato lahko tako kot pri drugih sestojnih vrstah vzpostavimo običajno ploskev za gozdni genetski monitoring (GGM) s 50 razmnoževalno aktivnimi drevesi. To so dominantna ali subdominantna drevesa, ki fenotipsko ustrezajo določilom, so med seboj oddaljena vsaj 30 m in bodo prispevala k razvoju novih generacij. Če drevo cveti, ga obravnavamo kot razmnoževalno aktivno.

Najprimernejši čas za vzpostavitev ploskve za gozdni genetski monitoring in izbiro dreves je spomladi, ko razmnoževalno aktivna drevesa cvetijo in lahko s tal poberejo želod za določitev vrst (križancev). Če ploskve ne moremo vzpostaviti v času cvetenja, lahko za prepoznavanje razmnoževalno aktivnih dreves uporabimo prsni

premer in socialni položaj drevesa, pri čemer se opiramo na strokovno znanje lokalnega gozdarja. Pri postavljanju ploskve moramo drevesa označiti in zabeležiti koordinate vseh dreves. Hkrati lahko izmerimo prsni premer in odvezamo vzorce za ekstrakcijo DNK.

Zaradi naravnega medsebojnega križanja hrastov je priporočljivo, da pred vzpostavitvijo ploskve za genetski monitoring opravimo morfometrične analize odpadlega listja in želoda za taksonomsko določitev vrst in populacije v gozdnem sestoju. Glavna merila za taksonomsko določanje hrastovih križancev so opisana v opisu vrst.

Potrebna oprema:

- naprava za merjenje razdalje (priporoča se daljnogled z laserskim daljinomerom),
- kompas,
- barva in čopič ali pršilka za označevanje dreves,
- premerka za merjenje prsnega premera,
- naprava GPS, ki je dovolj natančna in omogoča shranjevanje koordinat dreves.

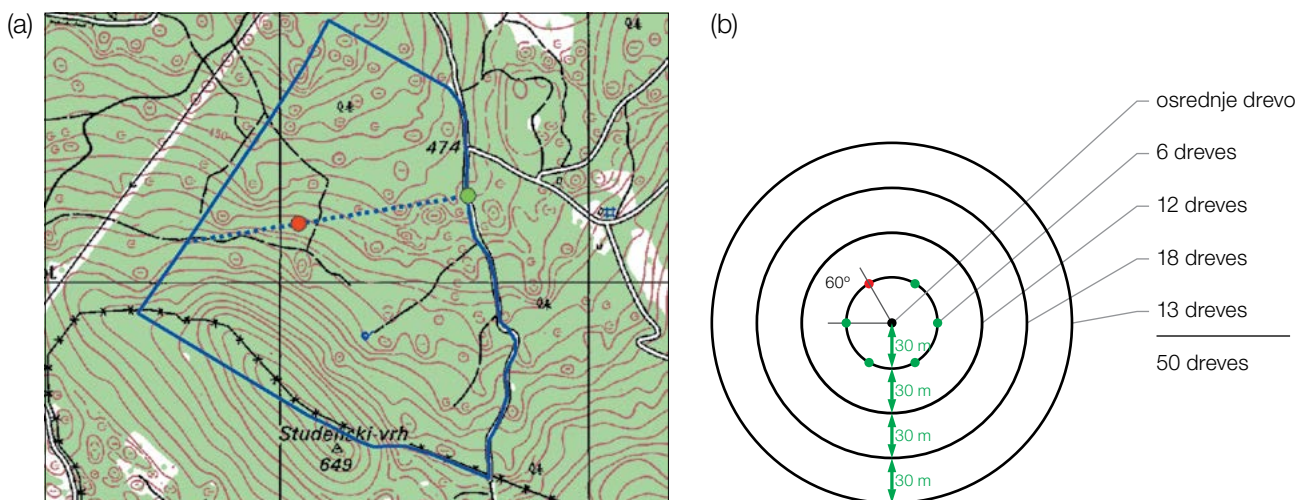
6.1 Vzpostavitev ploskve

6.1.1 Izbira središča ploskve

Splošni postopek za naključno izbiro mesta ploskve obsega korake, navedene v nadaljevanju (Slika 4a):

- naključna izbira točke (zelena pika na Sliki 4a) na zemljevidu na gozdni cesti ali poti, ki poteka ob sestoju,
- risanje črte, ki je približno pravokotna na cesto, iz naključno izbrane točke na cesti,
- naključna izbira točke na črti (rdeča pika na Sliki 4a) – ta točka je središče ploskve za gozdni genetski monitoring.

Najmanjša razdalja med izbrano središčno točko in mejo sestoja naj bo vsaj 150 metrov. Če izbrana središčna točka ne ustreza tej zahtevi, je treba izbrati novo točko ob upoštevanju protokola, opisanega zgoraj.



Slika 4: Naključna izbira središča ploskve za gozdni genetski monitoring (a); izbira dreves okoli predhodno izbranega osrednjega drevesa v koncentričnih krogih s polmeri, ki se povečujejo za 30 metrov (b).

Namesto postopka, opisanega zgoraj, lahko uporabimo tudi orodja za ustvarjanje naključnih točk v programski opremi GIS.

Koordinate izbrane točke shranimo v napravi GPS, ki se bo uporabljala na terenu.

6.1.2 Vzpostavitev ploskve na terenu

Razmnoževalno aktivno drevo, ki je na terenu najbližje predhodno shranjenim koordinatam GPS, postane središče ploskve za monitoring in se označi s številko 1.

Druga drevesa se izberejo okoli osrednjega drevesa v koncentričnih krogih s polmeri, ki se povečujejo za 30 metrov (Slika 4b). Prvo drevo v vsakem od krogov se izbere naključno, to pa se lahko naredi na različne načine: z naključnim azimutom (Preglednica 1), določenim od osrednjega drevesa, s pomočjo smeri sekundnega kazalca na analogni uri ali s katerim koli drugim pristopom, ki omogoča nepristransko izbiro. Preostala drevesa v vsakem od krogov izberemo z ustreznim povečanjem azimuta, da zagotovimo najmanjšo razdaljo 30 metrov med katerima koli drevesoma:

- +60° za prvi krog,
- +30° za drugi krog,
- +20° za tretji krog,
- +15° za četrti krog.

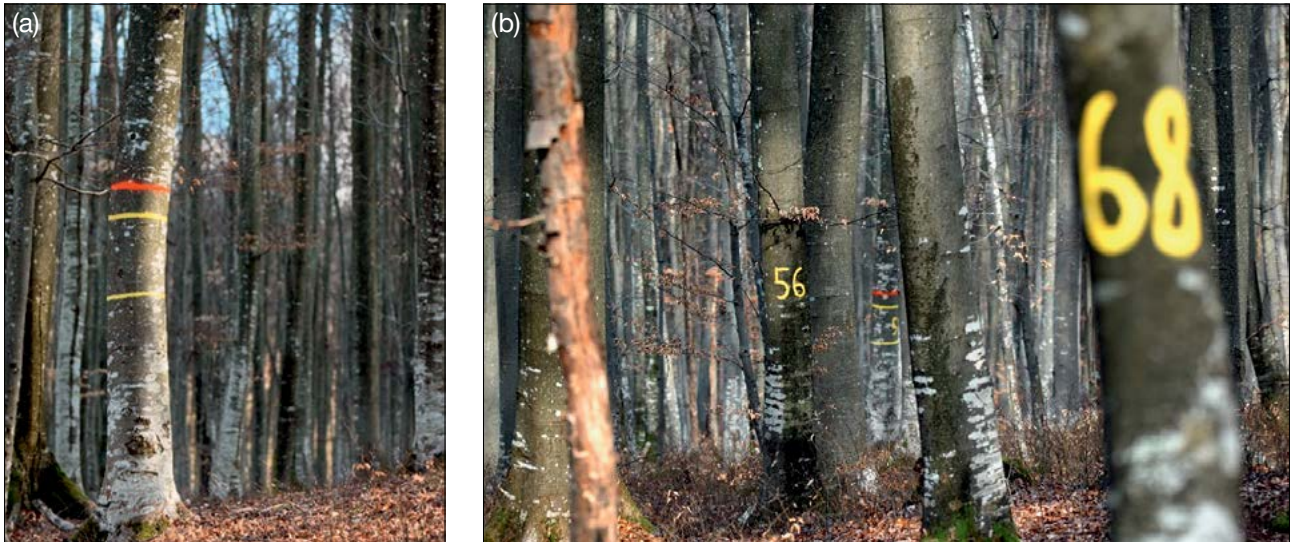
Če v notranjih treh krogih (Slika 4b) ni mogoče najti šestih, dvanajstih in osemnajstih dreves, izberemo dodatna drevesa v najbolj zunanjem krogu.

Preglednica 1: Naključni azimuti, ki jih lahko uporabimo za izbiro prvega drevesa v vsakem od krogov.

108	15	186	35	178	29	305	351	44	150
232	23	160	141	112	292	216	83	245	214
63	65	345	234	95	78	279	323	40	236
201	313	275	144	182	68	268	289	185	92
356	177	93	1	145	198	287	251	224	142

6.1.3 Označevanje dreves

Vsako izbrano drevo moramo označiti z ustrežno številko in po možnosti z barvno črto okoli debla za večjo vidnost dreves iz vseh smeri. Osrednje drevo (številka 1) označimo z dvema ali več črtami, da se bo razlikovalo od drugih dreves (Slika 5a). Številko je priporočljivo označiti na tisti strani drevesa, ki gleda stran od osrednjega drevesa, saj tako lažje najdemo osrednje drevo, zlasti če stojimo ob zunanjih krogih ploskve (Slika 5b).



Slika 5: a) osrednje drevo na ploskvi za genetski monitoring je označeno z več črtami, da se razlikuje od drugih dreves; b) številke so označene na izbranih drevesih tako, da gledajo stran od osrednjega drevesa. Na obeh slikah je prikazana ploskev za genetski monitoring navadne bukve (*Fagus sylvatica*).

6.2 Vzpostavitev podploskev za monitoring mladja

Vzpostavitev podploskev z mladjem se opravi v času kalitve po močnem ali masivnem obrodu.

Naravna pomladitvena jedra iz zadnjega obilnega obroda na terenu popišemo in zabeležimo njihove lokacije (koordinate GPS, številka drevesa, ki je najbližje pomladitvenemu jedru). Med vsemi popisanimi pomladitvenimi jedri jih naključno izberemo 20 za postavitev ploskve. Če je pomladitvenih jeder 20 ali manj, uporabimo vsa.

Znotraj vsakega izbranega pomladitvenega jedra postavimo podploskev za monitoring mladja s površino 1 m², ki jo označimo s kovinskimi palicami. Palice na vsakem oglišču podploskve zapičimo v tla, kolikor je mogoče globoko, da jih ne bi odstranile živali. Vrhove palic za boljšo vidnost pobarvamo.

6.3 Vzdrževanje ploskve

6.3.1 Splošno vzdrževanje

Označbe dreves in podploskev naravnega mladja redno (vsaki dve leti) pregledujemo in po potrebi obnovimo

6.3.2 Nadomeščanje dreves

Če opazovano drevo odmre ali se v okviru gospodarjenja poseka, ga moramo nadomestiti. Izberemo ustrezno drevo, ki je najbližje odmrlemu in izpolnjuje zahtevo po najmanjši oddaljenosti od najbližjega opazovanega drevesa 30 m. Če to ni mogoče, izberemo drevo z obrobja (najbolje na zunanjem krogu) ploskve za gozdni genetski monitoring. Nadomestno drevo se označi z naslednjo prosto številko, višjo od 50, tj. 51, 52, 53 itd., da ga lahko jasno ločimo od prvotno izbranih 50 dreves.

Če ima drevo poškodovano krošnjo, na primer zaradi vetroloma, žledoloma ali snegoloma, a lahko še obrodi, ga v monitoringu obdržimo. Vzrok poškodbe je treba zabeležiti, saj lahko poškodba vpliva na ugotovljene vrednosti verifikatorjev in dodatnih informacij. Če je škoda prehuda in obrod ni več pričakovan, moramo opazovano drevo nadomestiti.

7 Popis verifikatorjev in dodatnih informacij

Verifikatorje in dodatne informacije na ploskvi za monitoring redno popisujemo. Z verifikatorji spremljamo genetske lastnosti populacije ter njeno prilagajanje okoljskim spremembam in/ali upravljanju okolja, dodatne informacije pa popisujemo za lažjo razlago verifikatorjev.

Pri popisu verifikatorjev na višjih ravneh (standardna, napredna) moramo popisati tudi podatke za nižje ravni (osnovna, standardna). Pri popisu dodatnih informacij to ni potrebno.

Preglednica 2: Seznam verifikatorjev in dodatnih informacij s kratkim opisom in pogostostjo opazovanja za terensko popisovanje na ploskvah za genetski monitoring hrastov.

Ime	Osnovna raven	Standardna raven	Napredna raven	
Mortaliteta/ preživetje	Odrasla drevesa: štetje preostalih označenih dreves vsakih 10 let in po vsakem ekstremnem vremenskem pojavu/motnji	Enaka kot osnovna raven	Enaka kot osnovna raven	
	Mladje: /	Štetje preostalega mladja na podploskvah za monitoring mladja, dvakrat na desetletje	Enaka kot standardna raven	
Verifikatorji	Cvetenje	Opazovanje na ravni posameznih dreves ob dveh obilnih cvetenjih na desetletje, najbolje v enakomernih časovnih razmikih*	Kot standardna raven, vendar se dodatno popiše tudi faza razvoja moških cvetov*	
	Obrod	Opazovanje na ravni posameznih dreves, v istem letu kot ocena cvetenja na standardni ravni (ne glede na jakost obroda)*	Štetje plodov, v istem letu kot ocena cvetenja na napredni ravni, ne glede na jakost obroda* Za vsak ocenjeni obrod naberemo tudi semena za laboratorijske analize	
	Obilnost mladja	Ocena na ravni sestoja, vsako leto	Štetje mladja ustrezne starosti na podploskvah z mladjem v 1. in nato v 6. letu po vsakem ocenjenem obrodu	
Dodatne informacije	Porazdelitev debelinskih razredov	/	Meritev vsakih 10 let	
	Porazdelitev višinskih razredov	/	Meritev vsakih 10 let	
	Olistanje	/	Opazovanje na ravni posameznih dreves, vsakih 5 let	Opazovanje na ravni posameznih dreves, vsako leto
	Senescenca	/	Opazovanje na ravni posameznih dreves, vsakih 5 let	Opazovanje na ravni posameznih dreves, vsako leto

* Najbolje je, da vsako desetletje ocenimo vsaj en obilen obrod. Vendar pa vsakemu obilnemu cvetenju ne sledi nujno obilen obrod. Če ocenjenemu cvetenju ne sledi obilen obrod, moramo oceno cvetenja in obroda ponoviti ob naslednjem obilnem cvetenju, ne glede na to, koliko časa preteče med zaporednima obilnima cvetenjema. Obilno cvetenje in obrod prepoznamo z opazovanjem na osnovni ravni.

7.1 Protokoli za popis verifikatorjev

7.1.1 Mortalitet/preživetje

Mortaliteta opisuje mortaliteto odraslih dreves in naravnega mladja. Nasprotni pojem, preživetje, pomeni drevesa, ki so od zadnje ocene še živa. Oba parametra se izražata v relativnih enotah, tj. deležu odmrlih oziroma preživelih dreves. Preživetje izračunamo s formulo $1 - \text{mortaliteta}$.

7.1.1.1 Odrasla drevesa: osnovna, standardna in napredna raven

Verifikator mortaliteta odraslih dreves ocenimo tako, da preštejemo preostala živa označena drevesa vsakih 10 let in po vsakem ekstremnem vremenskem pojavu/motnji. Mortalitet je razlika med začetnim številom označenih dreves in številom še živih dreves izmed prvotnih 50.

7.1.1.2 Mladje: standardna in napredna raven

Mortaliteto mladja izračunamo iz ocen verifikatorja Obilnost naravnega mladja (razdelek 7.1.4). Mortalitet je razlika med začetnim številom mladja in številom še živega mladja ob naslednjem štetju. Za vsako ocenjevanje obilnosti mladje najprej preštejemo v letu kalitve in nato 5 let kasneje na standardni ravni, na napredni ravni pa še 10 in 15 let kasneje. Na standardni ravni za vsako ocenjevanje izračunamo mortaliteto po petih letih, na napredni ravni pa še po 10 in 15 letih. Obilnost mladja se ocenjuje dvakrat na desetletje, najbolje približno vsakih pet let.

7.1.2 Cvetenje

Ta verifikator opisuje jakost cvetenja in delež dreves, ki cvetijo. V srednji Evropi ga je mogoče popisati od aprila do maja. Cvetenje je zgodnejše, če je bila zima mila.

Moški cvetovi (Slika 7): Merilo za določitev začetka cvetenja je razvoj mačic. Moški cvetovi (mačice) se začnejo razvijati takoj po pojavu prvih listov, sproščanje peloda pa se začne, ko mačice zrastejo v dolžino in se odebelijo. Cvetenje moških cvetov se zaključí, ko v krošnji ni več moških cvetov, ki aktivno trosijo pelod. Mačice postanejo temno rjave barve in so podobne konsistence kot pajčevina.

Ženski cvetovi (Slika 6): Pri dobu in gradnu so ženski cvetovi zelo majhni in komaj opazni, zato se vse ocene cvetenja osredotočajo le na moške cvetove. Zaradi tega za razliko od drugih drevesnih vrst pri dobu in gradnu ne spremljamo dodatne informacije Usklajenost cvetenja.

7.1.2.1 Osnovna raven

Ta verifikator popišemo vsako leto na ravni sestoja. Popis opravimo, ko je cvetenje v polnem zamahu. Povprečno stanje ocenimo po pregledu celotne ploskve za monitoring. Zabeležimo dva rezultata, enega za jakost cvetenja, izraženo kot povprečni delež krošnje s cvetovi, in drugega za delež cvetočih dreves v sestoji.

Šifra	Jakost cvetenja na ravni sestoja	Povprečni delež krošnje s cvetovi (%)
1	Brez cvetenja: na drevesih ni cvetov ali so cvetovi le ponekod.	0–10
2	Šibko cvetenje: na drevesih je nekaj cvetov.	> 10–30
3	Zmerno cvetenje: na drevesih je zmerno število cvetov.	> 30–60
4	Močno cvetenje: na drevesih je veliko število cvetov.	> 60–90
5	Masivno cvetenje: na drevesih je ogromno število cvetov.	> 90

Šifra	Delež dreves v sestoji z navedeno jakostjo cvetenja (%)
1	0–10
2	> 10–30
3	> 30–60
4	> 60–90
5	> 90

7.1.2.2 Standardna raven

Ta verifikator popišemo ob dveh obilnih cvetenjih na desetletje, najbolje v enakomernih časovnih razmikih. Popišemo ga na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves. Cvetenje je obilno, ko je na osnovni ravni ocenjeno kot močno ali masivno (šifra 4 ali 5) in je delež dreves z navedeno stopnjo jakosti cvetenja večji od 60 % (šifra 4 ali 5). Popis opravimo, ko je cvetenje v polnem razmahu. Za vsako drevo navedemo en rezultat.

Šifra	Jakost cvetenja	Delež krošnje s cvetovi (%)
1	Brez cvetenja: na drevesu ni cvetov ali so cvetovi le ponekod.	0–10
2	Šibko cvetenje: na drevesu je nekaj cvetov.	> 10–30
3	Zmerno cvetenje: na drevesu je zmerno število cvetov.	> 30–60
4	Močno cvetenje: na drevesu je veliko število cvetov.	> 60–90
5	Masivno cvetenje: na drevesu je ogromno število cvetov.	> 90

7.1.2.3 Napredna raven

Ta verifikator popišemo ob dveh obilnih cvetenjih na desetletje, najbolje v enakomernih časovnih razmikih. Popišemo ga na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves. Cvetenje je obilno, ko je na osnovni ravni ocenjeno kot močno ali masivno (šifra 4 ali 5) in je delež dreves z navedeno stopnjo jakosti cvetenja večji od 60 % (šifra 4 ali 5). Povprečno sta potrebna dva obiska ploskve, prvi dovolj zgodaj, da opazujemo zgodnje faze cvetenja, in drugi, ko je cvetenje v polnem razmahu.

Za vsako drevo navedemo dva rezultata: faza moškega cvetenja in delež krošnje s cvetovi. Ker so ženski cvetovi doba in gradna zelo majhni in neopazni, zanesljiva ocena faze ženskega cvetenja v praksi ni mogoča. Delež cvetoče krošnje se nanaša na skupno število moških cvetov na drevesu. Ženske cvetove in faze moškega cvetenja prikazujeta sliki 6. in 7.

Šifra	Faza moškega cvetenja
1	Podaljšan pecelj – zaprti cvetovi (zeleno)
2	Prašniki sproščajo pelod (rumeno)
3	Prazni prašniki (pelod sproščen) (rjavo)

Šifra	Delež krošnje s cvetovi (% , moški cvetovi)
1	0–10
2	> 10–30
3	> 30–60
4	> 60–90
5	> 90

(a)



(b)



Slika 6: Ženski cvetovi doba (*Quercus robur*) (a) in gradna (*Q. petraea*) (b). Ženskega cvetenja ne ocenjujemo, saj so ženski cvetovi pri obeh vrstah preveč neopazni, da bi jih lahko na terenu zanesljivo opazovali.

1



2



3



Slika 7: Slikovni vodnik za opisovanje faz moškega cvetenja na napredni ravni verifikatorja Cvetenje za dob in graden.

7.1.3 Obrod

Ta verifikator opisuje prisotnost plodov in njihovo obilnost. Podatke za ta verifikator zbiramo v času obroda, v srednji Evropi od septembra do oktobra. Pri dobu želod dozori konec septembra ali na začetku oktobra, prej kot pri gradnu, pri katerem dozori oktobra.

7.1.3.1 Osnovna raven

Ta verifikator popišemo vsako leto na ravni sestoja. Povprečno stanje ocenimo po pregledu celotne ploskve za monitoring. Zabeležimo dva rezultata, enega za jakost obroda in drugega za delež dreves v sestoji, ki so obrodila.

Šifra	Jakost obroda na ravni sestoja	Povprečni delež krošnje s plodovi (%)
1	Brez obroda: na drevesih ni plodov ali so plodovi le ponekod.	0–10
2	Šibek obrod: na drevesih je nekaj plodov.	> 10–30
3	Zmeren obrod: na drevesih je zmerna količina plodov.	> 30–60
4	Močan obrod: na drevesih je veliko plodov.	> 60–90
5	Masiven obrod: na drevesih je ogromno plodov.	> 90

Šifra	Delež dreves v sestoji z navedeno jakostjo obroda (%)
1	0–10
2	> 10–30
3	> 30–60
4	> 60–90
5	> 90

7.1.3.2 Standardna raven

Ta verifikator popišemo v istih letih kot oceno cvetenja na standardni ravni (ne glede na jakost obroda). Popišemo ga na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves. Popis opravimo, preden plodovi, tj. želodi, začnejo odpadati. Za vsako drevo navedemo en rezultat.

Najbolje je, da po opaženih obilnih cvetenjih zajamemo vsaj en obilen obrod na desetletje. Vendar pa vsakemu obilnemu cvetenju ne sledi nujno obilen obrod. Če ocenjenemu cvetenju ne sledi obilen obrod, moramo oceno cvetenja in obroda ponoviti ob naslednjem obilnem cvetenju, ne glede na to, koliko časa preteče med zaporednima obilnima cvetenjema. Obilen obrod prepoznamo z opazovanjem na osnovni ravni. Obrod je obilen, ko je na osnovni ravni ocenjen kot močan ali masiven (šifra 4 ali 5) in je delež dreves z navedeno stopnjo jakosti obroda večji od 60 % (šifra 4 ali 5).

Šifra	Jakost obroda	Delež krošnje s plodovi (%)
1	Brez obroda: na drevesu ni plodov ali so plodovi le ponekod.	0–10
2	Šibek obrod: na drevesu je nekaj plodov.	> 10–30
3	Zmeren obrod: na drevesu je zmerna količina plodov.	> 30–60
4	Močan obrod: na drevesu je veliko plodov.	> 60–90
5	Masiven obrod: na drevesu je ogromno plodov.	> 90

7.1.3.3 Napredna raven

Ta verifikator popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves, v istih letih kot oceno cvetenja na napredni ravni, ne glede na jakost obroda. Popis opravimo, preden plodovi, tj. želodi, začnejo odpadati. Za

vsako drevo navedemo en rezultat in zabeležimo kateri del krošnje smo opazovali. Obenem naberemo želod za testiranje semen in genetsko analizo za verifikatorje in dodatne informacije na napredni ravni.

Najbolje je, da po opaženih obilnih cvetenjih zajamemo vsaj en obilen obrod na desetletje. Vendar pa vsakemu obilnemu cvetenju ne sledi nujno obilen obrod. Če ocenjenemu cvetenju ne sledi obilen obrod, moramo oceno cvetenja in obroda ponoviti ob naslednjem obilnem cvetenju, ne glede na to, koliko časa preteče med zaporednima obilnima cvetenjema. Obilen obrod prepoznamo z opazovanjem na osnovni ravni. Obrod je obilen, ko je na osnovni ravni ocenjen kot močan ali masiven (šifra 4 ali 5) in je delež dreves z navedeno stopnjo jakosti obroda večji od 60 % (šifra 4 ali 5).

Verifikator popišemo tako, da s pomočjo daljnogleda preštejemo plodove. Uporabimo povprečni rezultat treh zaporednih štetij. Rezultat vsakega štetja je število plodov, ki jih opazovalec lahko prešteje v 30 sekundah. Pri vseh drevesih moramo opazovati isti del krošnje. Ko izberemo del krošnje, ki ga bomo opazovali, moramo ob vsakem naslednjem spremljanju tega verifikatorja izbrati isti del krošnje. Zgornja tretjina krošnje je za štetje ustrežnejša od spodnjega in srednjega dela.

Zabeležimo dve vrednosti, število plodov in opazovani del krošnje.

Število plodov, prešteti v 30 sekundah (povprečje 3 štetij)

X

Šifra Opazovani del krošnje

1 Spodnji

2 Srednji

3 Zgornji

7.1.4 Obilnost mladja

Ta verifikator opisuje prisotnost in obilnost naravnega mladja na ploskvi za monitoring.

7.1.4.1 Osnovna raven

Ta verifikator popišemo na ravni sestoja, jeseni vsako leto. Za oceno uporabimo strokovno mnenje glede na stanje na celotni ploskvi za monitoring. Zabeležimo dve vrednosti, eno za novo naravno mladje (mladje, ki je vzkalilo v letu opazovanja (Slika 8)) in drugo za starejše mladje (mladje, starejše od enega leta).

Šifra Opis: novo mladje (mladje starosti do enega leta)

1a Na ploskvi ni novega mladja ali ga je zelo malo

2a Na ploskvi je zadostna količina novega mladja.

Šifra Opis: starejše mladje (mladje starejše od enega leta)

1b Na ploskvi ni starejšega mladja ali ga je zelo malo

2b Na ploskvi je zadostna količina starejšega mladja



Slika 8: Enoletna mladica

7.1.4.2 Standardna raven

Ta verifikator popišemo tako, da preštejemo mladice stare do enega leta prvo jesen po vsakem ocenjenem obrodu (leto obroda štejeemo kot leto 0) in nato 6. jesen po obrodu (takrat štejeemo 5 let staro mladje).

Hrastova semena niso dormantna in lahko poženejo že v letu, ki sledi obrodu. Ker se pri dobu in gradnu obilen obrod zgodi približno vsakih 5 do 7 let, naslednji krog monitoringa obilnosti mladja sledi naslednjemu obilnemu obrodu (približno 5 do 7 let po vzpostavitvi prejšnjih podploskev).

Štetje mladja:

Po vzpostavitvi podploskev za monitoring mladja moramo prešteti vse hrastovo mladje starosti do enega leta na vsaki izmed 20 podploskev. Starejšega hrastovega mladja na podploskvah ne štejeemo. Pri naslednjem štetju štejeemo samo mladje ustrezne starosti – v 6. letu štejeemo 5-letno mladje.

Rezultat štetja mladja na podploskvi

X

Mortaliteto/preživetje mladja izračunamo iz vrednosti, zabeleženih za ta verifikator.

Vzpostavitev podploskev je opisana v razdelku 6.2 - Vzpostavitev podploskev za monitoring mladja.

7.1.4.3 Napredna raven

Ta verifikator popišemo tako, da na vsaki od 20 podploskev z mladjem preštejemo mladje 1. jesen po vsakem ocenjenem obrodu (leto obroda štejejo kot leto 0) ter nato 6., 11. in 16. jesen po tem obrodu. Pri vsakem štetju štejemo samo mladje ustrezne starosti: 1. jesen mladje starosti do enega leta, 6. jesen 5-letno mladje, 11. jesen 10-letno mladje itn.

Preglednica 3: Časovni potek ocenjevanja obilnosti mladja. V tem primeru se prvi obrod zgodi v drugem letu monitoringa, drugi ocenjeni obrod pa pet let pozneje, tj. v 7. letu monitoringa. Po vsakem ocenjenem obrodu se vzpostavi novih dvajset podploskev za monitoring mladja. Monitoring obilnosti mladja se za vsako skupino 20 podploskev opravi vsakih pet let. Obrodi, iz katerih je zrastle ocenjevano mladje, in časovni potek ocenjevalnih dejavnosti so obarvani z enako barvo. Po zadnjem štetju mladja se monitoring obilnosti mladja na ustrezni skupini podploskev ustavi in podploskve se ukinejo. S – standardna raven; N – napredna raven.

Leto monitoringa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Obrod		•					•							•					•				
Ocena mladja za 1. ocenjeni obrod [leta]	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
Vzpostavitev podploskev z mladjem			SN																				
Štetje obilnosti mladja			SN				SN					N					N						
Ocena mladja za 2. ocenjeni obrod [leta]							0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Vzpostavitev podploskev z mladjem								SN															
Štetje obilnosti mladja								SN				SN					N						N

Mortaliteto/preživetje mladja izračunamo iz vrednosti, zabeleženih za ta verifikator.

Vzpostavitev podploskev je opisana v razdelku 6.2 - Vzpostavitev podploskev za monitoring mladja, štetje pa v razdelku 7.1.4.2 Standardna raven.

7.2 Protokoli za popis dodatnih informacij

7.2.1 Porazdelitev debelinskih razredov

7.2.1.1 Standardna in napredna raven

Prsni premer popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves, vsakih 10 let. Prsni premer je premer debla na višini 1,30 m, tj. približno v višini prsi odraslega človeka. Če ima drevo več kot eno deblo, izmerimo vsa in zabeležimo povprečno vrednost (vendar se skušamo izogniti drevesom s številnimi majhnimi debli). V opombe zapišemo, da je drevo večdebelno, in zabeležimo število izmerjenih debel. Če je drevo nagnjeno, prsni premer izmerimo pravokotno na drevesno deblo. Prsni premer lahko izmerimo na dva načina:

- 1) s premerko: v tem primeru izmerimo dva premera, pravokotno eden na drugega, in izračunamo povprečje;
- 2) z meritvijo obsega drevesa, iz katerega izračunamo premer (delimo ga s številom π , ~ 3,14, ali uporabimo pi-meter).

Prsni premer beležimo v cm. Pri vsakem naslednjem merjenju moramo uporabiti isto merilno metodo.

7.2.2 Porazdelitev višinskih razredov

7.2.2.1 Standardna in napredna raven

Višino popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves, vsakih 10 let. Višino izmerimo od tal do najvišjega dela krošnje, najbolje s klinometrom ali višinomerom (npr. Vertex). Višino beležimo v metrih, na eno decimalno mesto natančno. Če je krošnja poškodovana, moramo v opombe zapisati tudi to, skupaj z razlogom poškodbe.

7.2.3 Olistanje

Olistanje opisuje razvoj mladih listov. Popis te dodatne informacije opravimo samo na standardni in napredni ravni. Pri dobu in gradnu se olistanje začne hkrati s cvetenjem (pri dobu dva tedna prej kot pri gradnu). Podatke za olistanje v srednji Evropi zbiramo aprila in maja, do takrat, ko imajo vsa opazovana drevesa polno razvite liste. Olistanje je zgodnejše, če je bila zima mila.

7.2.3.1 Standardna raven

Na standardni ravni olistanje popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves, vsakih 5 let. Zanimata nas začetek (2. faza) in konec olistanja (4. faza). Opazovanje se preneha, ko vsa drevesa dosežejo 4. fazo. Običajno je potrebnih 6 obiskov. Za vsako drevo zabeležimo dve oceni: faza olistanja in delež krošnje z navedeno fazo olistanja. Faze olistanja prikazuje Slika 9.

Šifra	Faza olistanja
1	Brsti so popolnoma zaprti (zelenega ne vidimo)
2	Brsti se začenjajo odpirati (viden je prvi zeleni del)
3	Pojavljati se začenjajo zloženi listi z laski; vidni so posamezni zloženi listi z laski
4	Listi so popolnoma razprti, gladki in svetli

Šifra	Delež krošnje z navedeno fazo olistanja (%)
1	> 0–33
2	> 33–66
3	> 66–99
4	100

7.2.3.2 Napredna raven

Na napredni ravni olistanje popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves, vsako leto, na enak način kot na standardni ravni. Več podrobnosti je v razdelku 7.2.3.1 Standardna raven.



Slika 9: Slikovni vodnik za opisovanje olistanja na standardni in napredni ravni za dodatno informacijo »Olistanje«.

7.2.4 Senescenca

Senescenca opisuje proces senescence listov. Popis te dodatne informacije opravimo samo na standardni in napredni ravni.

7.2.4.1 Standardna raven

Na standardni ravni senescenco popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves vsakih 5 let. Zanima nas 3. faza, ko so listi rumeni in v njih več ne poteka fotosinteza. Opazovanje se preneha, ko vsa drevesa dosežejo 3. fazo. Običajno sta potrebna dva (2) obiska ploskve. Za vsako drevo zabeležimo dve oceni: faza senescence in delež krošnje z navedeno fazo senescence.

Šifra	Faza senescence
1	Listi so zeleni
2	Listi so zelene barve, ki se spreminja v rumeno (zelenkasto rumena)
3	Listi so rumene barve, ki se spreminja v rjavo (rjavkasta)
4	Listi so rjavi/odpadli

Šifra	Delež krošnje z navedeno fazo senescence (%)
1	> 0–33
2	> 33–66
3	> 66–99
4	100

7.2.4.2 Napredna raven

Senescenco popišemo na ravni posameznih dreves za vseh 50 opazovanih dreves, vsako leto, na enak način kot na standardni ravni. Več podrobnosti je v razdelku 7.2.4.1 Standardna raven.

Za vzpostavitev ploskve uporabite obrazec »GGM - Opis ploskve«.

Za popis verifikatorjev uporabite obrazec »GGM - Terenski verifikatorji«.

Za popis dodatnih informacij uporabite obrazec »GGM - Terenske dodatne informacije«.

8. Viri

- Breznikar A (1997) Morfološka in fenološka variabilnost doba (*Quercus robur* L.) in gradna (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.) na robnih območjih njunih naravnih habitatov v severovzhodni Sloveniji/Morphological and phenological variability of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) and sessile oak (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.) at the edge of their natural habitats in northeastern Slovenia. Master Thesis, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana. http://eprints.gozdis.si/800/1/Breznikar,Horvat-Marlot_1998.pdf. Pridobljeno 10 september 2020
- Brus R. (2005) Dendrologija za gozdarje/Dendrology for foresters. Biotehniška fakulteta, University of Ljubljana, Ljubljana
- Ballian D, Memišević-Hodžić M (2016) Variabilnost hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.) u Bosni i Hercegovini/Variability of the pedunculate oak (*Quercus robur* L.) in Bosnia and Herzegovina. *Silva Slovenica – Slovenian Forestry Institute*, Ljubljana
- Eriksson G (2015) *Quercus petraea* and *Quercus robur* - Recent Genetic Research. *Silva Slovenica - Slovenian Forestry Institute*, Ljubljana

5. Ducouso A, Bordacs S (2004) EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for pedunculate and sessile oaks (*Quercus robur* and *Q. petraea*). International Plant Genetic Resources Institute, Rome
6. Ducouso A, Michaud H, Lumaret R (1993) Reproduction and gene flow in the genus *Quercus* L. *Ann Sci For* 50(1):91 – 106. <https://doi.org/10.1051/forest:19930708>
7. Eaton E, Caudullo G, Oliveira S, de Rigo D (2016) *Quercus robur* and *Quercus petraea* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: San-Miguel-Ayanz J, de Rigo D, Caudullo G, Houston Durrant T, Mauri A (eds.) *European Atlas of Forest Tree Species*. Publ. Off. EU, Luxembourg, pp e01c6df+. https://ies-ows.jrc.ec.europa.eu/efdac/download/Atlas/pdf/Quercus_robur_petraea.pdf. Pridobljeno 15 oktober 2020
8. Kraigher H (2001) Semenarski praktikum. Skripta za strokovni seminar o gozdnem semenarstvu in predmet podiplomskega študija fiziologija gozdnega drevja/Seed technology practicum. A script for seminar on seed technology in forestry and for the course in postgraduate studies program on physiology of forest tree species. Slovenian Forestry Institute. Ljubljana
9. Kraigher H, Bogovič M, Westergren M (2010) Tehnične smernice za ohranjanje in rabo genskih virov : hrasti = *Quercus* spp. : Slovenija/Technical guidelines for conservation and use of forest genetic resources: Oak = *Quercus* spp.: Slovenia. *Gozdarski vestnik* 68(3):167-174

Za veljavno znanstveno nomenklaturu vrst so bili uporabljeni sledeči viri:

- a. CABI (2020) *Invasive Species Compendium*. CAB International, Wallingford, UK. www.cabi.org/isc. Pridobljeno 15 december 2020
- b. EPPO (2020) *EPPO Global Database* (available online). <https://gd.eppo.int>. Pridobljeno 15 december 2020
- c. GBIF (2020) *Global Biodiversity Information Facility*. <https://www.gbif.org> Pridobljeno 15 december 2020
- d. IPNI (2020) *International Plant Names Index*. The Royal Botanic Gardens, Kew, Harvard University Herbaria & Libraries & Australian National Botanic Gardens. <http://www.ipni.org>, Pridobljeno 10 december 2020
- e. National Center for Biotechnology Information (NCBI) (1998) *National Library of Medicine* (US), National Center for Biotechnology Information, Bethesda (MD). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Pridobljeno 15 december 2020
- f. Stevens PF (2001) *Angiosperm Phylogeny Website*, Version 14. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Pridobljeno 15 december 2020
- g. The Plant List (2013) Version 1.1. <http://www.theplantlist.org/>. Pridobljeno 12 december 2020
- h. Tropicos.org (2020) *Missouri Botanical Garden*. <http://www.tropicos.org>. Pridobljeno 15 december 2020
- i. WFO (2020) *World Flora Online*. <http://www.worldfloraonline.org>. Pridobljeno 15 december 2020





Priročnik za gozdni genetski monitoring

poglavje 10

Priloge

10.1 Opis opredelitve in zemljevidi območij monitoringa

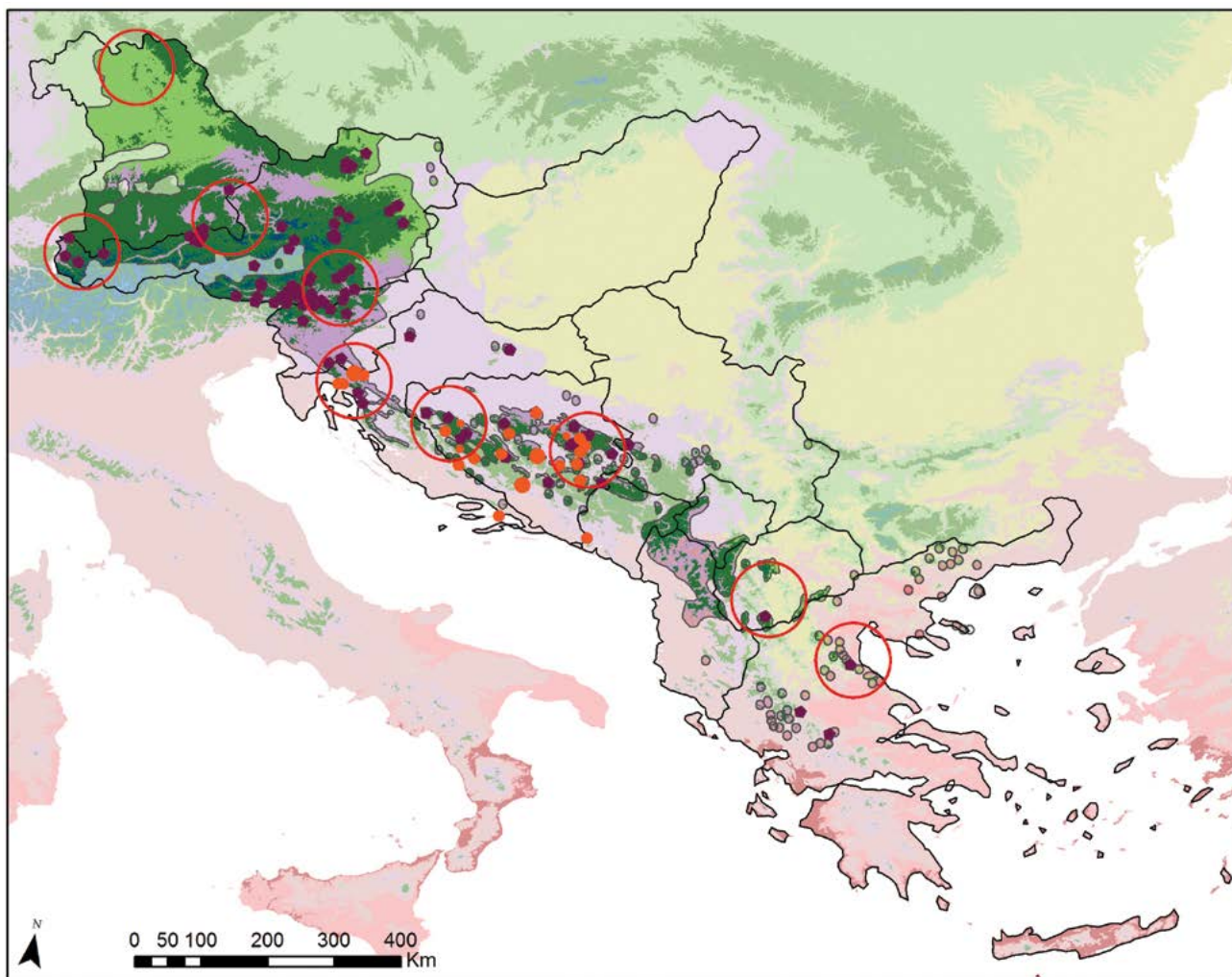
V zaporedju postopkov za izvedbo gozdnega genetskega monitoringa (GGM) je opredelitev območij GGM prednostna naloga. Pri projektu LIFEENMON so bila območja na transektu od Bavarske do Grčije razmejena ob uporabi pristopa, ki združuje razpoložljive znanstvene podatke in strokovno znanje.

Ta pristop temelji na reprezentativni pokritosti okoljskih con, pokritosti opisanih ras ali ekotipov, vključitvi marginalnih in perifernih populacij, prisotnosti že dodeljenih enot varovanja genov, ravneh obstoječe genetske variabilnosti (če so znane), pokritosti obstoječe genetske strukture/rekolonizacijskih poti, rezultatih provenienčnih poskusov (če so na voljo) in strokovnem znanju.

Uporabljenih je bilo sedem prednostnih vrst z različnimi biološkimi in ekološkimi lastnostmi ter razširjenostjo: kompleks bele in Borisove jelke (*Abies alba* Mill./*A. borisii-regis* Mafft.), navadna bukev (*Fagus sylvatica* L.), veliki jesen (*Fraxinus excelsior* L.), črni bor (*Pinus nigra* J. F. Arnold), evropski črni topol (*Populus nigra* L.), divja češnja (*Prunus avium* (L.) L.) in kompleks doba in gradna (*Quercus robur* L./*Q. petraea* (Matt.) Liebl.). Prepoznanih je bilo šest do devet območij monitoringa na vrsto/kompleks vrste, ki so predstavljena v nadaljevanju.

Območja monitoringa, kot so bila razmejena v okviru projekta LIFEENMON, veljajo za transekt od Bavarske do celinske Grčije. Če bi se ocenjevalo širše, panevropsko območje, bi bila območja monitoringa morda razmejena drugače.

Območja monitoringa za jelko (*Abies alba*, *A. borisii-regis*)



Legenda

Globalna okoljska cona

- B. Arktična
- C. Skrajno mrzla in mokra
- D. Skrajno mrzla in mokra
- E. Mrzla in mokra
- F. Skrajno mrzla in zmerno vlažna
- G. Mrzla in zmerno vlažna
- H. Zmerno hladna in suha
- J. Zmerno hladna in vlažna
- I. Zmerno hladna in zelo suha
- K. Zmerno topla in zmerno vlažna
- L. Zmerno topla in zelo suha
- N. Vroča in suha

○ Območje monitoringa

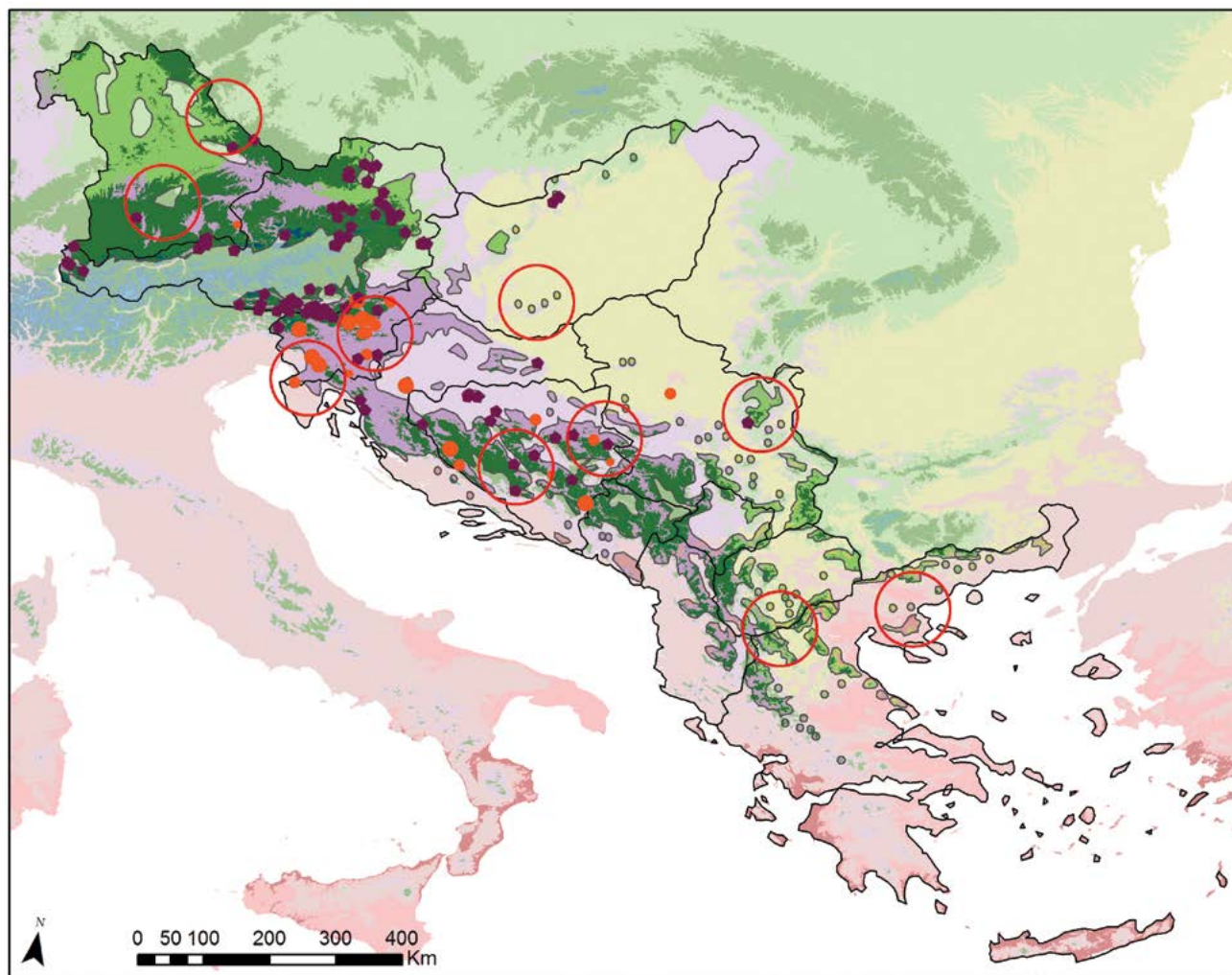
◆ Enote varovanja genov (GCU) EUFGIS

He (izoencimi)

- 0.12 - 0.14
- 0.14 - 0.16
- 0.16 - 0.18

Ta zemljevid je bil pripravljen v okviru projekta LIFE GENMON za prikaz območij genetskega monitoringa za transekt, ki sega od Bavarske do Grčije. Navajamo vire podatkov: Global Environmental Zones (Metzger in sod. 2012, Global Ecol. Biogeogr); območje razširjenosti vrst (www.euforgen.org); enote varovanja genov EUFGIS (EUFORGEN, projekt EUFGIS in nacionalne kontaktne točke) in genetski podatki (objavljene študije so na zahtevo na voljo v okviru projekta LIFE GENMON). Čeprav je Albanija del transekt, je bila izključena iz razmejitve območij monitoringa, saj za to državo ni bilo razpoložljivih podatkov.

Območja monitoringa za navadno bukev (*Fagus sylvatica*)



Legenda

Globalna okoljska cona

- B. Arktična
- C. Skrajno mrzla in mokra
- D. Skrajno mrzla in mokra
- E. Mrzla in mokra
- F. Skrajno mrzla in zmerno vlažna
- G. Mrzla in zmerno vlažna
- H. Zmerno hladna in suha
- J. Zmerno hladna in vlažna
- I. Zmerno hladna in zelo suha
- K. Zmerno topla in zmerno vlažna
- L. Zmerno topla in zelo suha
- N. Vroča in suha

○ Območje monitoringa

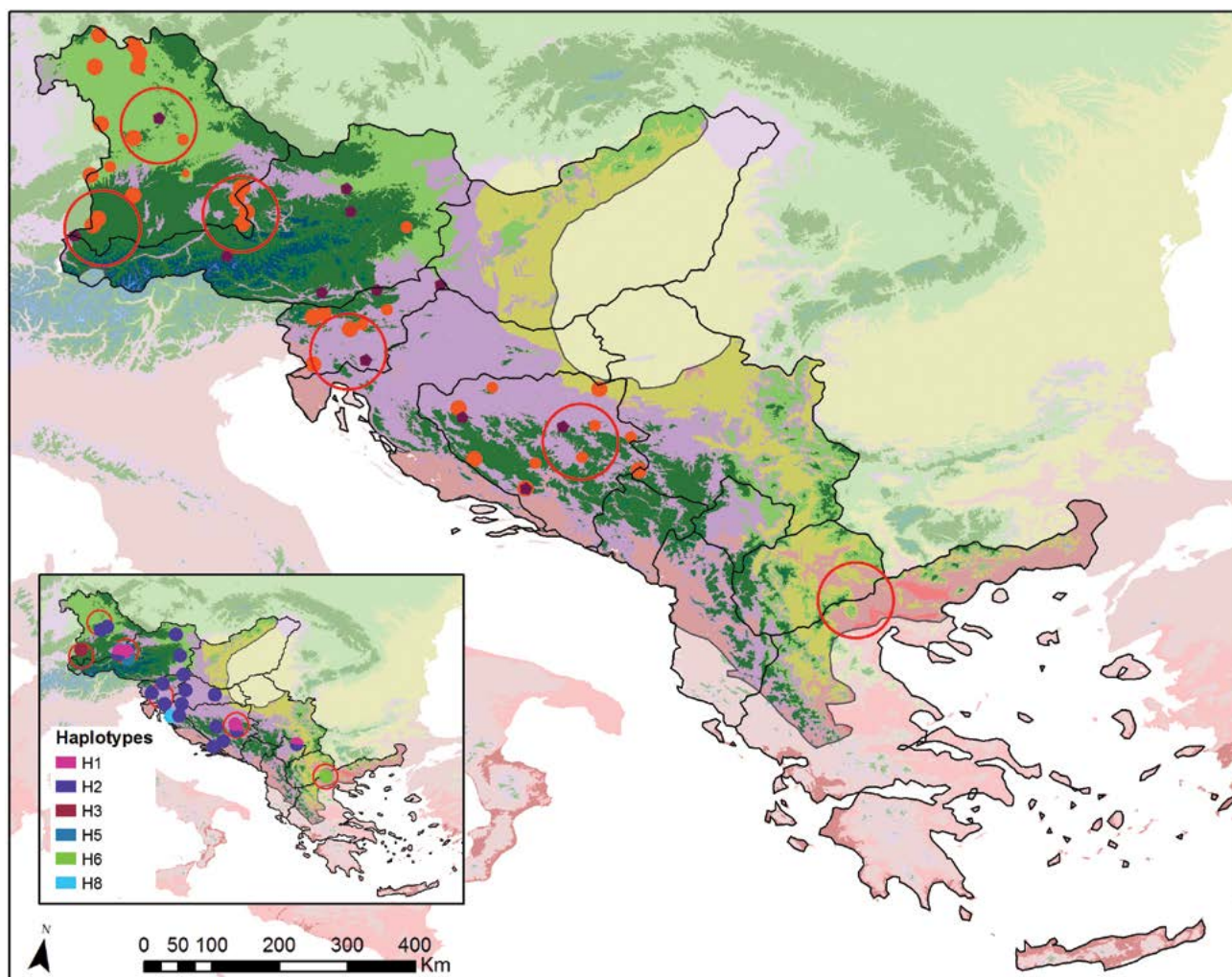
◆ **Enote varovanja genov (GCU) EUFGIS**

He (izoencimi)

- 0.21 - 0.23
- 0.23 - 0.25
- 0.25 - 0.28

Ta zemljevid je bil pripravljen v okviru projekta LIFE GENMON za prikaz območij genetskega monitoringa za transekt, ki sega od Bavarske do Grčije. Navajamo vire podatkov: Global Environmental Zones (Metzger in sod. 2012, Global Ecol. Biogeogr); območje razširjenosti vrst (www.euforgen.org); enote varovanja genov EUFGIS (EUFORGEN, projekt EUFGIS in nacionalne kontaktne točke) in genetski podatki (objavljene študije so na zahtevo na voljo v okviru projekta LIFE GENMON). Čeprav je Albanija del transekt, je bila izključena iz razmejitve območij monitoringa, saj za to državo ni bilo razpoložljivih podatkov.

Območja monitoringa za veliki jesen (*Fraxinus excelsior*)



Legenda

Globalna okoljska cona

- B. Arktična
- C. Skrajno mrzla in mokra
- D. Skrajno mrzla in mokra
- E. Mrzla in mokra
- F. Skrajno mrzla in zmerno vlažna
- G. Mrzla in zmerno vlažna
- H. Zmerno hladna in suha
- J. Zmerno hladna in vlažna
- I. Zmerno hladna in zelo suha
- K. Zmerno topla in zmerno vlažna
- L. Zmerno topla in zelo suha
- N. Vročna in suha

○ Območje monitoringa

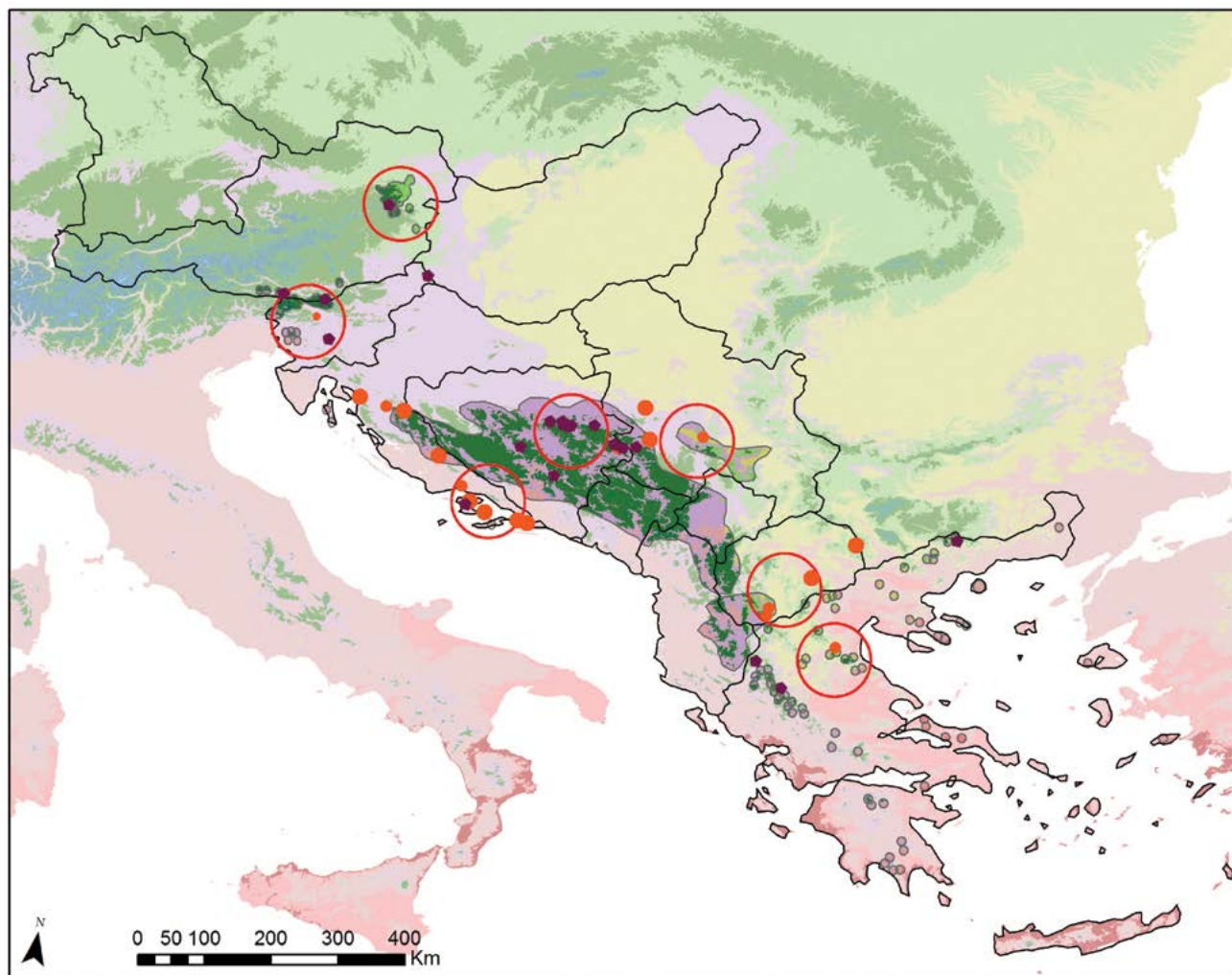
◆ Enote varovanja genov (GCU) EUFGIS

He (izoencimi)

- 0.85 - 0.72
- 0.72 - 0.79
- 0.79 - 0.88

Ta zemljevid je bil pripravljen v okviru projekta LIFEENMON za prikaz območij genetskega monitoringa za transekt, ki sega od Bavarske do Grčije. Navajamo vire podatkov: Global Environmental Zones (Metzger in sod. 2012, Global Ecol. Biogeogr); območje razširjenosti vrst (www.euforgen.org); enote varovanja genov EUFGIS (EUFORGEN, projekt EUFGIS in nacionalne kontaktne točke) in genetski podatki (objavljene študije so na zahtevo na voljo v okviru projekta LIFEENMON). Čeprav je Albanija del transekta, je bila izključena iz razmejitve območij monitoringa, saj za to državo ni bilo razpoložljivih podatkov.

Območja monitoringa za črni bor (*Pinus nigra*)



Legenda

Globalna okoljska cona

- B. Arktična
- C. Skrajno mrzla in mokra
- D. Skrajno mrzla in mokra
- E. Mrzla in mokra
- F. Skrajno mrzla in zmerno vlažna
- G. Mrzla in zmerno vlažna
- H. Zmerno hladna in suha
- J. Zmerno hladna in vlažna
- I. Zmerno hladna in zelo suha
- K. Zmerno topla in zmerno vlažna
- L. Zmerno topla in zelo suha
- N. Vroča in suha

○ Območje monitoringa

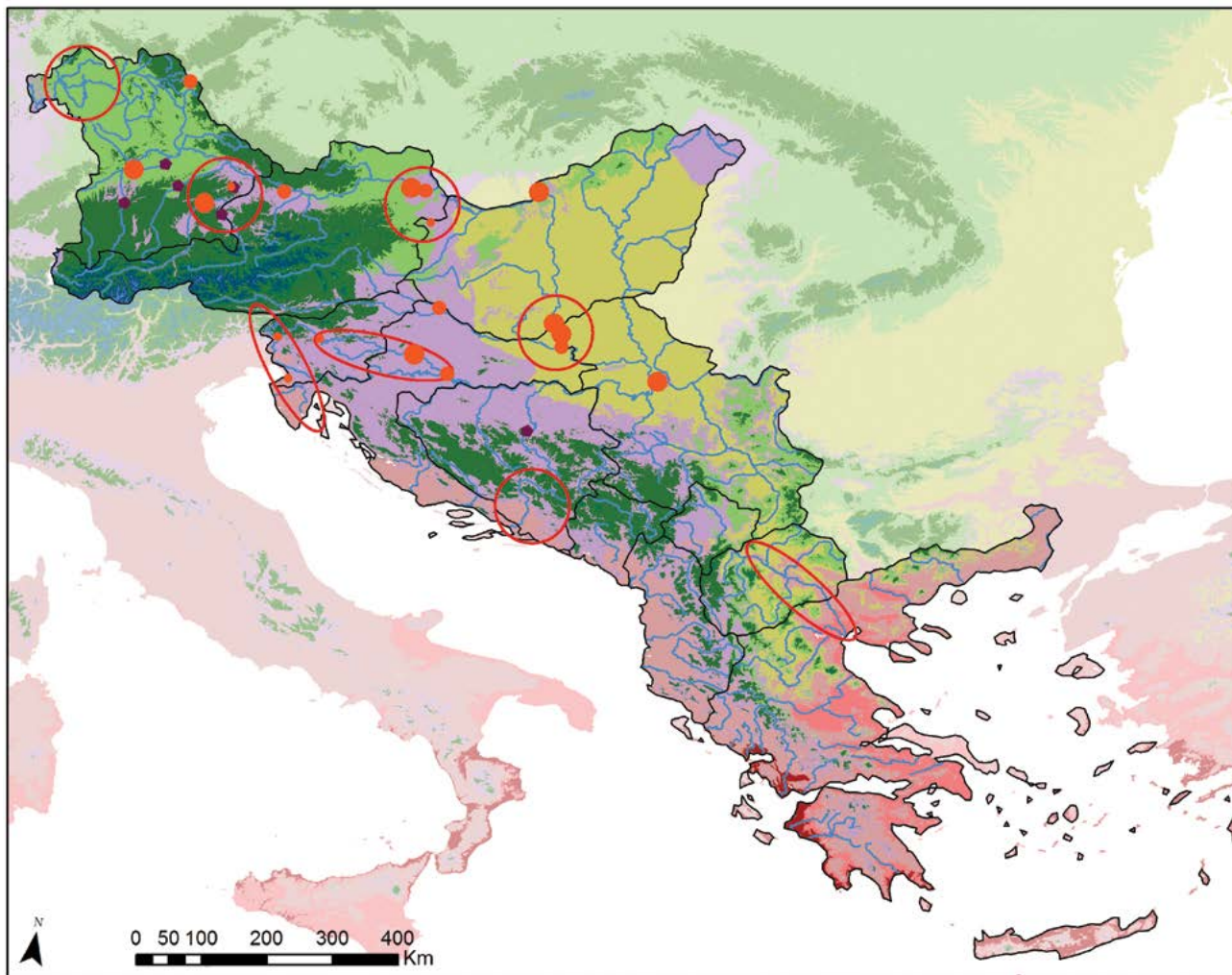
◆ Enote varovanja genov (GCU) EUFGIS

He (izoencimi)

- 0.00 - 0.12
- 0.12 - 0.24
- 0.24 - 0.36

Ta zemljevid je bil pripravljen v okviru projekta LIFE GENMON za prikaz območij genetskega monitoringa za transekt, ki sega od Bavarske do Grčije. Navajamo vire podatkov: Global Environmental Zones (Metzger in sod. 2012, Global Ecol. Biogeogr); območje razširjenosti vrst (www.euforgen.org); enote varovanja genov EUFGIS (EUFORGEN, projekt EUFGIS in nacionalne kontaktne točke) in genetski podatki (objavljene študije so na zahtevo na voljo v okviru projekta LIFE GENMON). Čeprav je Albanija del transekt, je bila izključena iz razmejitve območij monitoringa, saj za to državo ni bilo razpoložljivih podatkov.

Območja monitoringa za črni topol (*Populus nigra*)



Legenda

Globalna okoljska cona

- B. Arktična
- C. Skrajno mrzla in mokra
- D. Skrajno mrzla in mokra
- E. Mrzla in mokra
- F. Skrajno mrzla in zmerno vlažna
- G. Mrzla in zmerno vlažna
- H. Zmerno hladna in suha
- J. Zmerno hladna in vlažna
- I. Zmerno hladna in zelo suha
- K. Zmerno topla in zmerno vlažna
- L. Zmerno topla in zelo suha
- N. Vročna in suha

○ Območje monitoringa

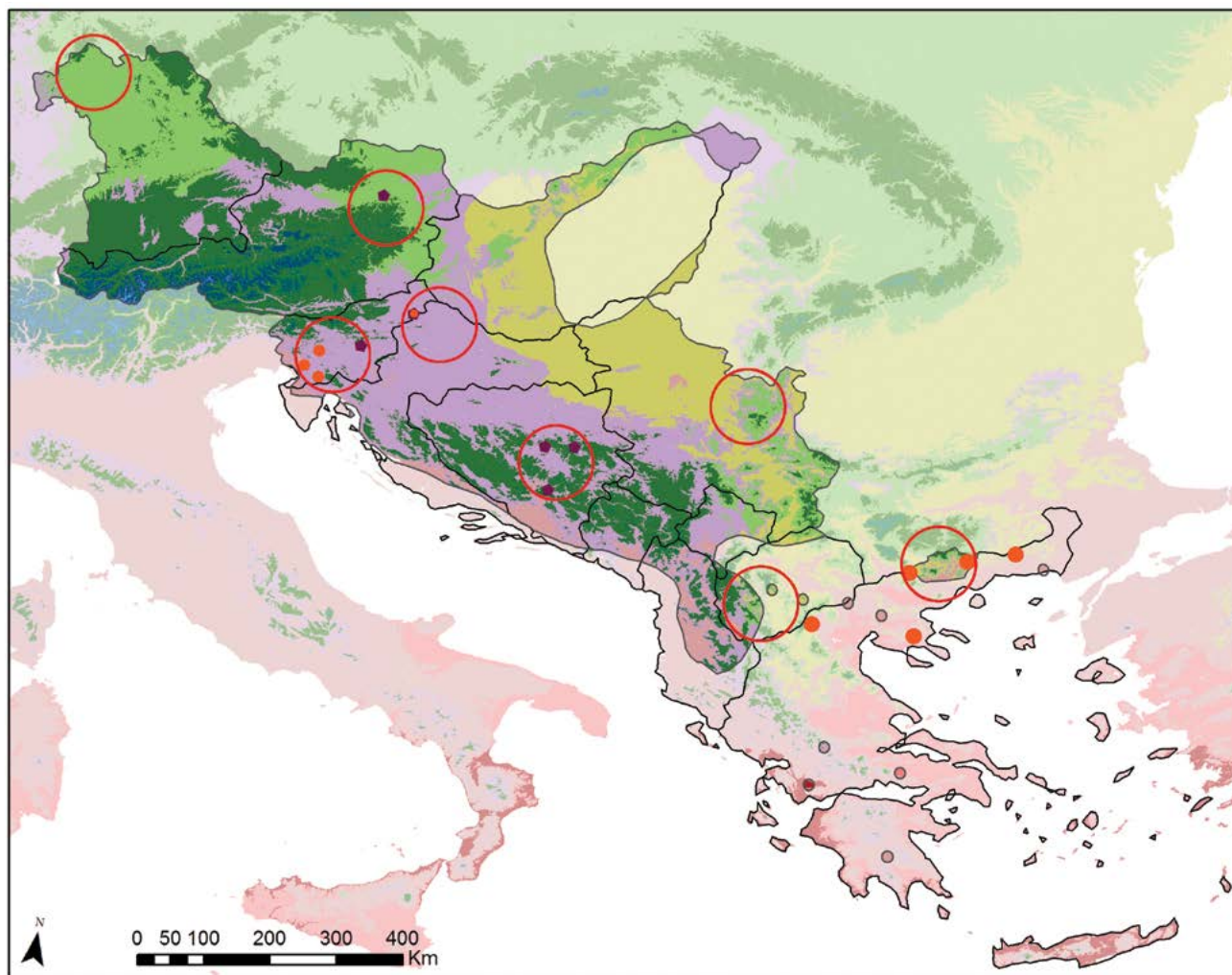
◆ Enote varovanja genov (GCU) EUFGIS

He (izoencimi)

- 0.74 - 0.77
- 0.77 - 0.80
- 0.80 - 0.83

Ta zemljevid je bil pripravljen v okviru projekta LIFE GENMON za prikaz območij genetskega monitoringa za transekt, ki sega od Bavarske do Grčije. Navajamo vire podatkov: Global Environmental Zones (Metzger in sod. 2012, Global Ecol. Biogeogr); območje razširjenosti vrst (www.euforgen.org); enote varovanja genov EUFGIS (EUFORGEN, projekt EUFGIS in nacionalne kontaktne točke) in genetski podatki (objavljene študije so na zahtevo na voljo v okviru projekta LIFE GENMON). Čeprav je Albanija del transekt, je bila izključena iz razmejitve območij monitoringa, saj za to državo ni bilo razpoložljivih podatkov.

Območja monitoringa za divjo češnjo (*Prunus avium*)



Legenda

Globalna okoljska cona

- B. Arktična
- C. Skrajno mrzla in mokra
- D. Skrajno mrzla in mokra
- E. Mrzla in mokra
- F. Skrajno mrzla in zmerno vlažna
- G. Mrzla in zmerno vlažna
- H. Zmerno hladna in suha
- J. Zmerno hladna in vlažna
- I. Zmerno hladna in zelo suha
- K. Zmerno topla in zmerno vlažna
- L. Zmerno topla in zelo suha
- N. Vroča in suha

○ Območje monitoringa

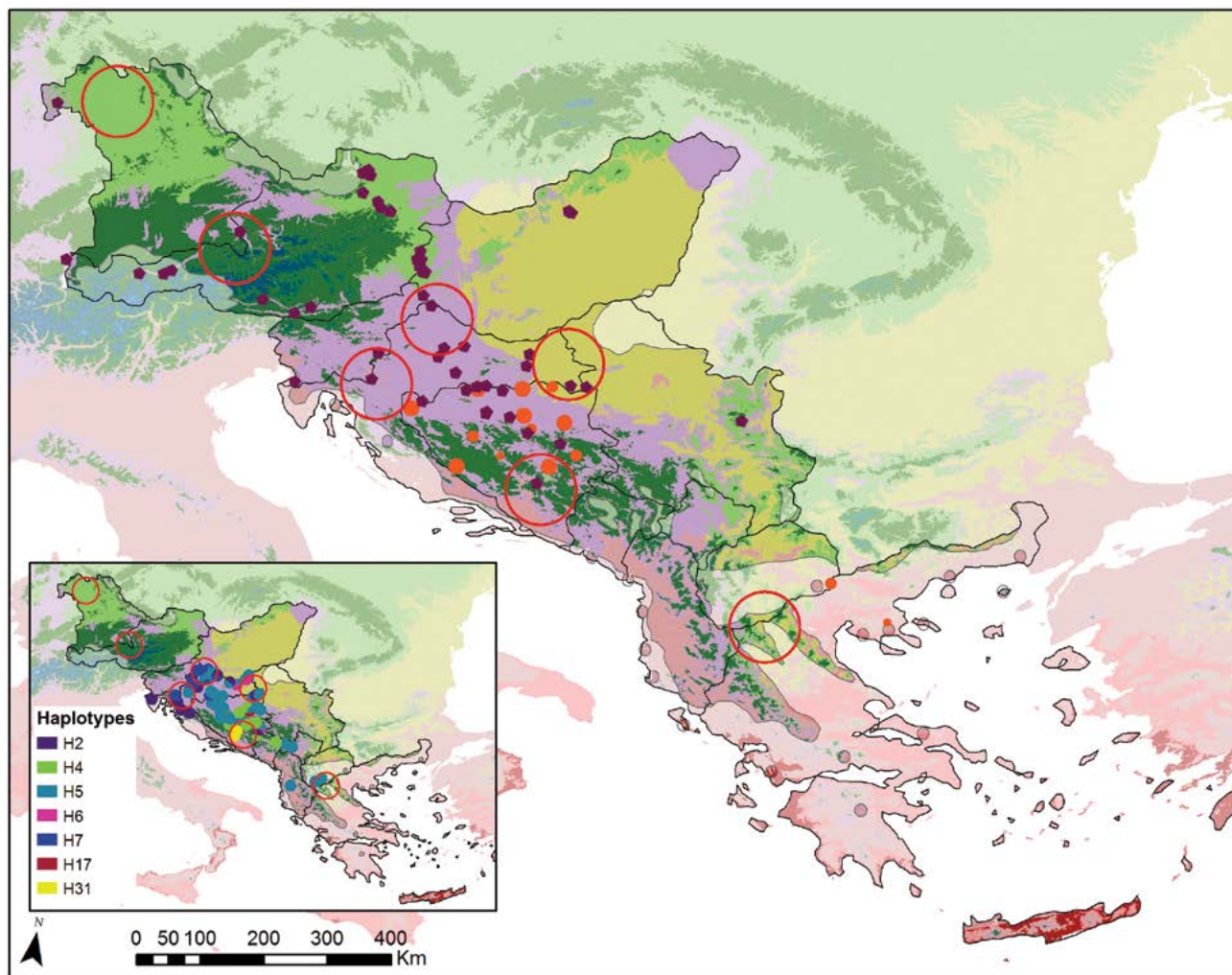
◆ **Enote varovanja genov (GCU) EUFGIS**

He (izoencimi)

- 0.57 - 0.63
- 0.63 - 0.70
- 0.70 - 0.77

Ta zemljevid je bil pripravljen v okviru projekta LIFE GENMON za prikaz območij genetskega monitoringa za transekt, ki sega od Bavarske do Grčije. Navajamo vire podatkov: Global Environmental Zones (Metzger in sod. 2012, Global Ecol. Biogeogr); območje razširjenosti vrst (www.euforgen.org); enote varovanja genov EUFGIS (EUFORGEN, projekt EUFGIS in nacionalne kontaktne točke) in genetski podatki (objavljene študije so na zahtevo na voljo v okviru projekta LIFE GENMON). Čeprav je Albanija del transekt, je bila izključena iz razmejitve območij monitoringa, saj za to državo ni bilo razpoložljivih podatkov.

Območja monitoringa za hraste (*Quercus robur*, *Q. petraea*)



Legenda

Globalna okoljska cona

- B. Arktična
- C. Skrajno mrzla in mokra
- D. Skrajno mrzla in mokra
- E. Mrzla in mokra
- F. Skrajno mrzla in zmerno vlažna
- G. Mrzla in zmerno vlažna
- H. Zmerno hladna in suha
- J. Zmerno hladna in vlažna
- I. Zmerno hladna in zelo suha
- K. Zmerno topla in zmerno vlažna
- L. Zmerno topla in zelo suha
- N. Vročna in suha

○ Območje monitoringa

◆ **Enote varovanja genov (GCU) EUFGIS**

He (izoencimi)

- 0.78 - 0.82
- 0.82 - 0.85
- 0.85 - 0.89

Ta zemljevid je bil pripravljen v okviru projekta LIFEENMON za prikaz območij genetskega monitoringa za transekt, ki sega od Bavarske do Grčije. Navajamo vire podatkov: Global Environmental Zones (Metzger in sod. 2012, Global Ecol. Biogeogr); območje razširjenosti vrst (www.euforgen.org); enote varovanja genov EUFGIS (EUFORGEN, projekt EUFGIS in nacionalne kontaktne točke) in genetski podatki (objavljene študije so na zahtevo na voljo v okviru projekta LIFEENMON). Čeprav je Albanija del transekt, je bila izključena iz razmejitve območij monitoringa, saj za to državo ni bilo razpoložljivih podatkov.

Dodatne podatke so prispevali

Vlatko ANDONOVSKI¹, Evangelia V. AVRAMIDOU^{2,3}, Roland BAIER⁴,
Sandor BORDAC⁵, Andrej BREZNIKAR⁶, Ioannis V. GANOPOULOS²,
Mladen IVANKOVIĆ⁷, Davorin KAJBA⁸, Heino KONRAD⁹, Ermioni MALLIAROU²,
Saša ORLOVIĆ¹⁰, Srđan STOJNIĆ¹⁰

Povezane ustanove:

1. Fakulteta za gozdarstvo, Univerza sv. Cirila in Metoda v Skopju, Severna Makedonija
2. Aristotelova univerza v Solunu (AUTH), Grčija
3. Inštitut za sredozemske gozdne ekosisteme, DEMETER, Grčija
4. Bavarski urad za gozdno genetiko (AWG), Nemčija
5. Univerza Szent István, Budimpešta, Madžarska
6. Zavod za gozdove Slovenije (ZGS), Slovenija
7. Hrvaški gozdarski inštitut, Jastrebarsko, Hrvaška
8. Univerza v Zagrebu, Fakulteta za gozdarstvo, Hrvaška
9. Zvezni gozdarski center za raziskave in usposabljanje, oddelek za nevarnosti naravnih nesreč in pokrajino (BFW), Avstrija
10. Inštitut za nižinsko gozdarstvo in okolje (ILFE), Novi Sad, Srbija

10.2 Obrazci za terensko opazovanje

10.2.1 Obrazec za opis ploskve

10.2.2 Obrazec za popis terenskih verifikatorjev

10.2.3 Obrazec za popis terenskih dodatnih informacij

10.2.1 Obrazec za opis ploskve

OBRAZEC ZA OPIS PLOSKVE ZA GOZDNI GENETSKI MONITORING

PODATKI OPISA PLOSKVE

Opazovana drevesna vrsta	Velikost ploskve	Starost sestoja (razpon, od-do)
	ha	let

Točen položaj*

Zemljepisna širina (N)	Zemljepisna dolžina (E)	Nadmorska višina (m, n. v.)
° ' " N	° ' " E	m

Lastništvo	
Informacije o lastniku (zaupne informacije: parcelne številke, katastrska številka itd.)	
Gozdnogospodarsko območje	
Gozdnogospodarska enota	
Oddelek	
Odsek	
Koda ploskve za gozdni genetski monitoring	

	Latinsko ime vrste	Delež v %
Opazovana drevesna vrsta in njen delež v sestoju		
Neciljne vrste in njihov delež v sestoju		
Neciljne vrste in njihov delež v sestoju		
Neciljne vrste in njihov delež v sestoju		

Regionalna klasifikacija v rastiščnogojitvene razrede	
--	--

Matična podlaga	
------------------------	--

Fitocenološka združba (po Braun-Blanquet)	
--	--

Tip tal (po FAO, 1971–1981)*	
-------------------------------------	--

Vlažnost tal (suha/zmerno vlažna/mokra)	
--	--

**Založenost tal s hranili (velika/srednja/
majhna)**

**Regionalna klasifikacija gozdnih
rastišč**

Klimogram

Povprečna letna temperatura (°C)

**Povprečna letna temperatura (°C) v
vegetacijskem obdobju**

**Povprečna temperatura v
najtoplejšem mesecu (julij) (°C)**

**Povprečna količina padavin v
vegetacijskem obdobju (mm)**

Ellenbergov podnebni kvocient (EQ)

CILJI GOSPODARJENJA Z GOZDOVI:

1. Proizvodnja lesa
2. Osredotočenost na habitate
3. Osredotočenost na rekreacijo/
estetiko
4. Osredotočenost na raznovrstno
uporabo
5. Drugo – navedite:

GOZDNOGOJITVENI SISTEM:

1. Zastorna sečnja
2. Sečnja na panj
3. Sproščena tehnika gojenja gozdov
4. Selektivna sečnja
5. Drugo – navedite:

OPREDELJEN STATUS:

1. Gozdni rezervat
2. Območje varovanja genov
3. Zaščiteno območje
4. Drugo – navedite:

**Če je ploskev izvzeta iz gospodarjenja,
navedite, od kdaj**

* FAO/UNESCO (1971–1981), svetovni zemljevid tal FAO-UNESCO.

KAKOVOST IN OPIS SESTOJA

Zdravstveno stanje gozda

Vzroke slabega ali srednje dobrega zdravja opišite v opombah

Dobro	Srednje dobro	Slabo

Gospodarjenje z gozdom

	Da	Ne
Gospodarjenje se izvaja		

Zgodovina sestoja (izvor)

Če je zasajen, navedite izvor gozdnega reprodukcijskega materiala (če je znan)

Naravno obnovljen	Zasajen

Izvor

Avtohton	Neavtohton	Neznan

Naravna obnova

Redka	Zmerna	Pogosta

Struktura mladja

V skupinah	Enakomerno porazdeljeno

Izoliranost

Izoliranost od najbližjega sestoja iste vrste v oddaljenosti najmanj 400 m

	Da	Ne
Izoliranost		

Razdrobljenost

Vrsta razpršena (vidnega je nekaj združevanja)

	Da	Ne
Razdrobljenost		

Vertikalna struktura sestoja

Enoslojna	Dvoslojna	Večslojna

Horizontalna struktura sestoja

Odrptost krošenj in razmik med njimi

Enakomerna	Enakomerna z odprtini	Neenakomerna z odprtini

Razdalja med drevesi/ skupinami dreves

Genetski podatki

	Da	Ne
Na voljo		

Izpostavljenost pobočja

S	SV	V	JV
J	JZ	Z	SZ

Pobočje

< 5 %	5–15 %	15–40 %

Pretekli popisi cvetenja, obroda a(semenskih let) in nabiranje semena

	Leto	Količina semena
Cvetenje		
Obrod		
Nabiranje semena		

Oblika krošnje

Dobra	Srednje dobra	Slaba

Kakovost drevesnih debel v splošnem

Ravnost zgornjega dela, razsohljost itd.

Dobra	Srednje dobra	Slaba

Dostopnost

Dostopnost za nabiranje semena/plezanje

Dobra	Srednje dobra	Slaba

Opombe:

Datum: _____ Ime/priimek/podpis: _____

10.2.2 Obrazec za popis terenskih verifikatorjev

Ploskev:		Podpis:
Drevesna vrsta:		
Datum:		
Ocenjevalec:		

Verifikator: mortaliteta

Osnovna, standardna, napredna raven

Označite s križcem.

Drevo	Živo	Mrtvo	Drevo	Živo	Mrtvo	Drevo	Živo	Mrtvo	Drevo	Živo	Mrtvo	Drevo	Živo	Mrtvo
1			11			21			31			41		
2			12			22			32			42		
3			13			23			33			43		
4			14			24			34			44		
5			15			25			35			45		
6			16			26			36			46		
7			17			27			37			47		
8			18			28			38			48		
9			19			29			39			49		
10			20			30			40			50		

Opombe:

Ploskev:		Podpis:
Drevesna vrsta:		
Datum:		
Ocenjevalec:		

Verifikator: cvetenje

Osnovna raven

Obkrožite ustrezno kodo.

Intenzivnost cvetenja sestoja	
Šifra	Povprečni odstotek krošnje s cvetovi
1	0–10
2	> 10–30
3	> 30–60
4	> 60–90
5	> 90

Delež dreves v sestoji z navedeno fazo intenzivnosti cvetenja (%)	
Šifra	% dreves
1	0–10
2	> 10–30
3	> 30–60
4	> 60–90
5	> 90

Standardna raven

Vnesite šifro. Za vrednosti šifer glejte smernice.

Delež krošnje s cvetovi za posamezno drevo

Drevo	Šifra	Drevo	Šifra	Drevo	Šifra	Drevo	Šifra	Drevo	Šifra
1		11		21		31		41	
2		12		22		32		42	
3		13		23		33		43	
4		14		24		34		44	
5		15		25		35		45	
6		16		26		36		46	
7		17		27		37		47	
8		18		28		38		48	
9		19		29		39		49	
10		20		30		40		50	

Ploskev:		Podpis:
Drevesna vrsta:		
Datum:		
Ocenjevalec:		

Napredna raven

Vnesite šifro. Za vrednosti šifer glejte smernice.

Faza ženskega in moškega cvetenja ter delež krošnje s cvetovi (moški in ženski cvetovi skupaj) za posamezno drevo

Drevo	Šifra za žensko cvetenje	Šifra za moško cvetenje	Šifra za % krošnje s cvetovi	Drevo	Šifra za žensko cvetenje	Šifra za moško cvetenje	Šifra za % krošnje s cvetovi
1				26			
2				27			
3				28			
4				29			
5				30			
6				31			
7				32			
8				33			
9				34			
10				35			
11				36			
12				37			
13				38			
14				39			
15				40			
16				41			
17				42			
18				43			
19				44			
20				45			
21				46			
22				47			
23				48			
24				49			
25				50			

Ploskev:		Podpis:
Drevesna vrsta:		
Datum:		
Ocenjevalec:		

Verifikator: obrod

Osnovna raven

Obkrožite ustrezno šifro.

Intenzivnost obroda sestoja	
Šifra	Povprečni % krošnje s plodovi
1	0–10
2	> 10–30
3	> 30–60
4	> 60–90
5	> 90

Delež dreves v sestoji z navedeno fazo intenzivnosti obroda (%)	
Šifra	% dreves
1	0–10
2	> 10–30
3	> 30–60
4	> 60–90
5	> 90

Standardna raven

Vnesite šifro. Za vrednosti šifer glejte smernice.

Intenzivnost obroda posameznega drevesa

Drevo	Šifra	Drevo	Šifra	Drevo	Šifra	Drevo	Šifra	Drevo	Šifra
1		11		21		31		41	
2		12		22		32		42	
3		13		23		33		43	
4		14		24		34		44	
5		15		25		35		45	
6		16		26		36		46	
7		17		27		37		47	
8		18		28		38		48	
9		19		29		39		49	
10		20		30		40		50	

Ploskev:		Podpis:
Drevesna vrsta:		
Datum:		
Ocenjevalec:		

Napredna raven

Po štetju vnesite število plodov in šifro za opazovani del krošnje. Za vrednosti šifer glejte smernice.

Obilnost obroda na navedenem delu krošnje

Drevo	Št. plodov	Del krošnje	Drevo	Št. plodov	Del krošnje	Male flowering code	% of crown flowering code
1				26			
2				27			
3				28			
4				29			
5				30			
6				31			
7				32			
8				33			
9				34			
10				35			
11				36			
12				37			
13				38			
14				39			
15				40			
16				41			
17				42			
18				43			
19				44			
20				45			
21				46			
22				47			
23				48			
24				49			
25				50			

Ploskev:		Podpis:
Drevesna vrsta:		
Datum:		
Ocenjevalec:		

Verifikator: obilnost mladja

Osnovna raven

Obkrožite ustrezno šifro.

Šifra	Opis: novo mladje (mladje iz tega leta)
1a	Na ploskvi ni novega mladja ali ga je zelo malo
2a	Na ploskvi je zadostna količina novega mladja

Šifra	Opis: starejše mladje (mladje starejše od enega leta)
1b	Na ploskvi ni starejšega mladja ali ga je zelo malo
2b	Na ploskvi je zadostna količina starejšega mladja

Standardna raven

Po štetju vnesite število.

Starost mladja: _____

Starost mladja: _____

Pod-ploskev	Št. mladja	Pod-ploskev	Št. mladja
1		11	
2		12	
3		13	
4		14	
5		15	
6		16	
7		17	
8		18	
9		19	
10		20	

Pod-ploskev	Št. mladja	Pod-ploskev	Št. mladja
1		11	
2		12	
3		13	
4		14	
5		15	
6		16	
7		17	
8		18	
9		19	
10		20	

Ploskev:		Podpis:
Drevesna vrsta:		
Datum:		
Ocenjevalec:		

Napredna raven

Po štetju vnesite število.

Starost mladja: _____

Pod-ploskev	Št. mladja	Pod-ploskev	Št. mladja
1		11	
2		12	
3		13	
4		14	
5		15	
6		16	
7		17	
8		18	
9		19	
10		20	

Starost mladja: _____

Pod-ploskev	Št. mladja	Pod-ploskev	Št. mladja
1		11	
2		12	
3		13	
4		14	
5		15	
6		16	
7		17	
8		18	
9		19	
10		20	

Starost mladja: _____

Pod-ploskev	Št. mladja	Pod-ploskev	Št. mladja
1		11	
2		12	
3		13	
4		14	
5		15	
6		16	
7		17	
8		18	
9		19	
10		20	

10.2.3 Obrazec za popis terenskih dodatnih informacij

Ploskev:		Podpis:
Drevesna vrsta:		
Datum:		
Ocenjevalec:		

Dodatne informacije: porazdelitev debelinskih razredov

Standardna, napredna raven

Po merjenju vnesite število.

Drevo	Prsni premer [cm]	Drevo	Prsni premer [cm]	Drevo	Prsni premer [cm]	Drevo	Prsni premer [cm]	Drevo	Prsni premer [cm]
1		11		21		31		41	
2		12		22		32		42	
3		13		23		33		43	
4		14		24		34		44	
5		15		25		35		45	
6		16		26		36		46	
7		17		27		37		47	
8		18		28		38		48	
9		19		29		39		49	
10		20		30		40		50	

Dodatne informacije: porazdelitev višinskih razredov

Standardna, napredna raven

Po merjenju vnesite število.

Drevo	Višina [m]	Drevo	Višina [m]	Drevo	Višina [m]	Drevo	Višina [m]	Drevo	Višina [m]
1		11		21		31		41	
2		12		22		32		42	
3		13		23		33		43	
4		14		24		34		44	
5		15		25		35		45	
6		16		26		36		46	
7		17		27		37		47	
8		18		28		38		48	
9		19		29		39		49	
10		20		30		40		50	

Ploskev:		Podpis:
Drevesna vrsta:		
Datum:		
Ocenjevalec:		

Dodatne informacije: olistanje

Standardna, napredna raven

Vnesite šifro. Za vrednosti šifer glejte smernice.

Drevo	Faza	% krošnje	Drevo	Faza	% krošnje	Drevo	Faza	% krošnje	Drevo	Faza	% krošnje	Drevo	Faza	% krošnje
1			11			21			31			41		
2			12			22			32			42		
3			13			23			33			43		
4			14			24			34			44		
5			15			25			35			45		
6			16			26			36			46		
7			17			27			37			47		
8			18			28			38			48		
9			19			29			39			49		
10			20			30			40			50		

Dodatne informacije: senescenca

Standardna, napredna raven

Vnesite šifro. Za vrednosti šifer glejte smernice. Relevantno samo za drevesne vrste, ki odvržejo liste.

Drevo	Faza	% krošnje	Drevo	Faza	% krošnje	Drevo	Faza	% krošnje	Drevo	Faza	% krošnje	Drevo	Faza	% krošnje
1			11			21			31			41		
2			12			22			32			42		
3			13			23			33			43		
4			14			24			34			44		
5			15			25			35			45		
6			16			26			36			46		
7			17			27			37			47		
8			18			28			38			48		
9			19			29			39			49		
10			20			30			40			50		

Ploskev:		Podpis:
Drevesna vrsta:		
Datum:		
Ocenjevalec:		

Dodatne informacije: razmerje med spoloma

Standardna raven

Vnesite šifro. Za vrednosti šifer glejte smernice. Relevantno samo za dvodomne/poligamne vrste, kot so jesen, topol ...

Drevo	Spol	Drevo	Spol	Drevo	Spol	Drevo	Spol	Drevo	Spol
1		11		21		31		41	
2		12		22		32		42	
3		13		23		33		43	
4		14		24		34		44	
5		15		25		35		45	
6		16		26		36		46	
7		17		27		37		47	
8		18		28		38		48	
9		19		29		39		49	
10		20		30		40		50	

Ploskev:		Podpis:
Drevesna vrsta:		
Datum:		
Ocenjevalec:		

Napredna raven

Vnesite odstotek moških/ženskih/dvospolnih socvetij. Relevantno samo za poligamne vrste, kot je jesen ...

Drevo	% moških socvetij	% ženskih socvetij	% dvospolnih socvetij	Drevo	% moških socvetij	% ženskih socvetij	% dvospolnih socvetij
1				26			
2				27			
3				28			
4				29			
5				30			
6				31			
7				32			
8				33			
9				34			
10				35			
11				36			
12				37			
13				38			
14				39			
15				40			
16				41			
17				42			
18				43			
19				44			
20				45			
21				46			
22				47			
23				48			
24				49			
25				50			

Ploskev:		Podpis:
Drevesna vrsta:		
Datum:		
Ocenjevalec:		

Dodatne informacije: odmiranje krošnje

Osnovna, standardna, napredna raven

Vnesite šifro. Za vrednosti šifer glejte smernice. Relevantno samo za vrste s hudim odmiranjem krošnje, kot je jesen ...

Drevo	Šifra	Drevo	Šifra	Drevo	Šifra	Drevo	Šifra	Drevo	Šifra
1		11		21		31		41	
2		12		22		32		42	
3		13		23		33		43	
4		14		24		34		44	
5		15		25		35		45	
6		16		26		36		46	
7		17		27		37		47	
8		18		28		38		48	
9		19		29		39		49	
10		20		30		40		50	

10.3 Dodatne preglednice za 7. poglavje: Ocena stroškov

Preglednica S7.1: Ocena stroškov za gozdni genetski monitoring navadne bukve (*Fagus sylvatica* L.) v Nemčiji. Prvi interval gozdnega genetskega monitoringa (Interval: 1.) se loči od naslednjih (Interval: 1+N.). P – potrošni material; Z – storitve zunanjih izvajalcev; G – gozdar; T – tehnik; R – raziskovalec; K-D – kilometrini in dnevnice; t – čas vožnje.

Dejavnost	Interval	Raven	Material		Delo			Potni stroški			Skupaj	
			P	Z	G	T	R	stroški	K-D	t		t
			[€]	[€]	[del. ur]	[del. ur]	[del. ur]	[€]	[€]	[del. ur]		[€]
Izbira ploskve	1.	osnovna	0	0	40	0	40	2.791	395	28	972	4.158
		standardna	0	0	40	0	40	2.791	395	28	972	4.158
		napredna	0	0	40	0	40	2.791	395	28	972	4.158
	1+N.	osnovna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		standardna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		napredna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vzpostavitev ploskve	1.	osnovna	525	0	0	12	15	854	395	11	357	2.130
		standardna	845	0	0	23	28	1.614	553	22	710	3.722
		napredna	845	0	0	23	28	1.614	553	22	710	3.722
	1+N.	osnovna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		standardna	320	0	0	13	15	884	184	13	411	1.799
		napredna	320	0	0	13	15	884	184	13	411	1.799
Terenska opazovanja	1.	osnovna	0	0	0	0	121	4.554	1.753	74	2.809	9.116
		standardna	0	0	0	46	421	17.033	3.559	152	5.558	26.150
		napredna	0	0	0	43	830	32.407	8.139	322	11.972	52.518
	1+N.	osnovna	0	0	0	1	130	4.906	1.780	76	2.875	9.561
		standardna	0	0	0	47	398	16.176	3.586	154	5.613	25.375
		napredna	0	0	0	87	823	33.214	8.442	344	12.555	54.210
Vzorčenje	1.1+N.	osnovna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		standardna	10	0	0	7	7	417	158	11	347	932
		napredna	10	3.616	0	7	43	1.778	704	22	802	6.910
	1.	osnovna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		standardna	7	0	0	1	1	83	79	6	173	342
		napredna	7	3.616	0	1	37	1.443	625	17	624	6.315
Lab. analize	1.	osnovna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		standardna	2.100	0	0	33	80	3.836	0	0	0	5.936
		napredna	13.340	0	0	224	80	8.485	0	0	0	21.825
	1+N.	osnovna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		standardna	1.400	0	0	24	80	3.614	0	0	0	5.014
		napredna	12.640	0	0	215	80	8.263	0	0	0	20.903
Skupaj	1.	osnovna	525	0	40	12	176	8.198	2.543	113	4.138	15.405
		standardna	2.955	0	40	109	576	25.690	4.665	214	7.587	40.898
		napredna	14.195	3.616	40	296	1.021	47.074	9.791	395	14.456	89.132
	1+N.	osnovna	0	0	0	1	130	4.906	1.780	76	2.875	9.561
		standardna	1.727	0	0	85	494	20.757	3.849	173	6.197	32.530
		napredna	12.967	3.616	0	315	955	43.805	9.251	374	13.590	83.228

Preglednica S7.2: Ocena stroškov za gozdni genetski monitoring bele jelke (*Abies alba* Mill.) v Nemčiji. Prvo obdobje gozdnega genetskega monitoringa (Interval: 1.) se loči od naslednjih (Interval: 1+N.). P – potrošni material; Z – storitve zunanjih izvajalcev; G – gozdar; T – tehnik; R – raziskovalec; K-D – kilometrini in dnevnice; t – čas vožnje.

Dejavnost	Interval	Raven	Material		Delo			Potni stroški			Skupaj	
			P	Z	G	T	R	stroški	K-D	t		t
			[€]	[€]	[del. ur]	[del. ur]	[del. ur]	[€]	[€]	[del. ur]	[€]	[€]
Izbira ploskve	1.	osnovna	0	0	40	0	40	2.791	395	28	972	4.158
		standardna	0	0	40	0	40	2.791	395	28	972	4.158
		napredna	0	0	40	0	40	2.791	395	28	972	4.158
	1+N.	osnovna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		standardna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		napredna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vzpostavitev ploskve	1.	osnovna	525	0	0	12	15	854	395	11	357	2.130
		standardna	845	0	0	23	28	1.614	553	22	710	3.722
		napredna	845	0	0	23	28	1.614	553	22	710	3.722
	1+N.	osnovna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		standardna	320	0	0	13	15	884	184	13	411	1.799
		napredna	320	0	0	13	15	884	184	13	411	1.799
Terenska opazovanja	1.	osnovna	0	0	0	0	121	4.554	1.753	74	2.809	9.116
		standardna	0	0	0	46	396	16.088	3.261	141	5.141	24.490
		napredna	97	0	0	43	748	29.299	6.649	267	9.884	45.928
	1+N.	osnovna	0	0	0	1	130	4.906	1.780	76	2.875	9.561
		standardna	0	0	0	47	354	14.494	3.288	143	5.185	22.967
		napredna	5	0	0	87	746	30.285	6.952	288	10.485	47.727
Vzorčenje	1.1+N.	osnovna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		standardna	10	0	0	3	3	192	158	11	347	707
		napredna	10	3.616	0	15	15	938	704	22	694	5.962
	1+N.	osnovna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		standardna	7	0	0	1	1	83	79	6	173	342
		napredna	7	3.616	0	13	13	829	625	17	520	5.597
Lab. analize	1.	osnovna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		standardna	2.100	0	0	33	80	3.836	0	0	0	5.936
		napredna	13.340	0	0	216	80	8.290	0	0	0	21.630
	1+N.	osnovna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		standardna	1.400	0	0	24	80	3.614	0	0	0	5.014
		napredna	12.640	0	0	207	80	8.068	0	0	0	20.708
Skupaj	1.	osnovna	525	0	40	12	176	8.198	2.543	113	4.138	15.405
		standardna	2.955	0	40	105	547	24.520	4.367	203	7.170	39.012
		napredna	14.292	3.616	40	296	911	42.931	8.301	339	12.259	81.399
	1+N.	osnovna	0	0	0	1	130	4.906	1.780	76	2.875	9.561
		standardna	1.727	0	0	85	450	19.075	3.551	162	5.769	30.122
		napredna	12.972	3.616	0	319	854	40.067	7.761	318	11.416	75.831

Preglednica S7.3: Ocena stroškov za gozdni genetski monitoring navadne bukve (*Fagus sylvatica* L.) v Grčiji. Prvo obdobje gozdnega genetskega monitoringa (Interval: 1.) se loči od naslednjih (Interval: 1+N.). P – potrošni material; Z – storitve zunanjih izvajalcev; G – gozdar; T – tehnik; R – raziskovalec; K-D – kilometrini in dnevnice; t – čas vožnje.

Dejavnost	Interval	Raven	Material		Delo			Potni stroški			Skupaj	
			P	Z	G	T	R	stroški	K-D	t		t
			[€]	[€]	[del. ur]	[del. ur]	[del. ur]	[€]	[€]	[del. ur]	[€]	[€]
Izbira ploskve	1.	osnovna	0	0	40	0	40	1.076	424	33	440	1.939
		standardna	0	0	40	0	40	1.076	424	33	440	1.939
		napredna	0	0	40	0	40	1.076	424	33	440	1.939
	1+N.	osnovna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		standardna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		napredna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vzpostavitev ploskve	1.	osnovna	434	0	21	0	23	582	254	20	266	1.536
		standardna	754	0	32	0	36	909	424	33	444	2.530
		napredna	754	0	32	0	36	909	424	33	444	2.530
	1+N.	osnovna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		standardna	320	0	16	0	18	461	198	15	207	1.186
		napredna	320	0	16	0	18	461	198	15	207	1.186
Terenska opazovanja	1.	osnovna	0	0	40	0	81	1.700	1.282	87	1.232	4.214
		standardna	0	0	1.276	40	308	19.911	2.621	244	2.998	25.530
		napredna	0	0	5.042	40	458	65.428	5.679	647	7.642	78.749
	1+N.	osnovna	0	0	42	0	91	1.896	1.311	89	1.268	4.474
		standardna	0	0	1.278	40	286	19.614	2.650	247	3.014	25.277
		napredna	0	0	5.050	80	456	66.034	6.004	672	7.945	79.982
Vzorčenje	1.1+N.	osnovna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		standardna	16	0	11	0	11	287	169	13	176	648
		napredna	16	10.000	47	0	47	1.255	508	39	528	12.307
	1+N.	osnovna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		standardna	11	0	5	0	5	125	85	7	88	309
		napredna	11	10.000	41	0	41	1.094	424	33	440	11.968
Lab. analize	1.	osnovna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		standardna	862	1.235	0	38	80	1.744	0	0	0	3.842
		napredna	6.919	7.824	0	246	80	4.523	0	0	0	19.266
	1+N.	osnovna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		standardna	575	824	0	29	80	1.618	0	0	0	3.016
		napredna	6.631	7.412	0	237	80	4.397	0	0	0	18.440
Skupaj	1.	osnovna	434	0	101	0	143	3.358	1.960	140	1.938	7.690
		standardna	1.632	1.235	1.358	78	474	23.927	3.638	323	4.058	34.490
		napredna	7.689	17.824	5.160	286	660	73.191	7.035	752	9.054	114.791
	1+N.	osnovna	0	0	42	0	91	1.896	1.311	89	1.268	4.474
		standardna	905	824	1.299	69	389	21.818	2.932	268	3.309	29.788
		napredna	6.962	17.412	5.107	317	595	71.986	6.625	720	8.592	111.576

* Fenološka opazovanja (terenska opazovanja) so bila izvedena na podlagi digitalne fotografije in analize slik. Table S7.4: Cost assessment of forest genetic monitoring of King Boris' fir (*Abies borisii-regis* Maff.) in Greece. The first Forest genetic monitoring interval (Interval 1st) is distinguished from subsequent intervals (Interval 1+Nth). C – consumables; O – outsourcing; F – forester; T – technician; R – researcher; M-S – mileage and subsistence; t – time travelling.

Preglednica S7.4: Ocena stroškov za gozdni genetski monitoring borisove jelke (*Abies borisii-regis* Mattf.) v Grčiji. Prvo obdobje gozdnega genetskega monitoringa (Interval: 1.) se loči od naslednjih (Interval: 1+N.). P – potrošni material; Z – storitve zunanjih izvajalcev; G – gozdar; T – tehnik; R – raziskovalec; K-D – kilometrini in dnevnice; t – čas vožnje.

Dejavnost	Interval	Raven	Material		Delo			Potni stroški			Skupaj	
			P	Z	G	T	R	stroški	K-D	t		t
			[€]	[€]	[del. ur]	[del. ur]	[del. ur]	[€]	[€]	[del. ur]	[€]	[€]
Izbira ploskve	1.	osnovna	0	0	40	0	40	1.076	424	33	440	1.939
		standardna	0	0	40	0	40	1.076	424	33	440	1.939
		napredna	0	0	40	0	40	1.076	424	33	440	1.939
	1+N.	osnovna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		standardna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		napredna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vzpostavitev ploskve	1.	osnovna	434	0	21	0	23	582	254	20	266	1.536
		standardna	754	0	32	0	36	909	424	33	444	2.530
		napredna	754	0	32	0	36	909	424	33	444	2.530
	1+N.	osnovna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		standardna	320	0	16	0	18	461	198	15	207	1.186
		napredna	320	0	16	0	18	461	198	15	207	1.186
Terenska opazovanja	1.	osnovna	0	0	40	0	81	1.700	1.282	87	1.232	4.214
		standardna	0	0	1.048	40	304	17.235	2.421	218	2.703	22.359
		napredna	0	0	3.902	40	438	52.044	4.679	516	6.133	62.855
	1+N.	osnovna	0	0	42	0	91	1.896	1.311	89	1.268	4.474
		standardna	0	0	1.050	40	282	16.937	2.450	220	2.719	22.106
		napredna	0	0	3.910	80	436	52.650	5.004	541	6.437	64.090
Vzorčenje	1.1+N.	osnovna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		standardna	16	0	11	0	11	287	169	13	176	648
		napredna	16	5.008	47	0	47	1.255	508	39	528	7.315
	1+N.	osnovna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		standardna	11	0	5	0	5	125	85	7	88	309
		napredna	11	5.008	41	0	41	1.094	424	33	440	6.976
Lab. analize	1.	osnovna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		standardna	809	882	0	36	80	1.714	0	0	0	3.405
		napredna	6.583	5.588	0	236	80	4.384	0	0	0	16.556
	1+N.	osnovna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		standardna	540	588	0	27	80	1.591	0	0	0	2.719
		napredna	6.314	5.294	0	227	80	4.262	0	0	0	15.870
Skupaj	1.	osnovna	434	0	101	0	143	3.358	1.960	140	1.938	7.690
		standardna	1.579	882	1.130	76	470	21.219	3.438	297	3.763	30.882
		napredna	7.353	10.596	4.020	276	640	59.668	6.035	621	7.545	91.196
	1+N.	osnovna	0	0	42	0	91	1.896	1.311	89	1.268	4.474
		standardna	870	588	1.071	67	385	19.115	2.732	242	3.015	26.319
		napredna	6.644	10.302	3.967	307	575	58.466	5.625	589	7.084	88.122

* Fenološka opazovanja (terenska opazovanja) so bila izvedena na podlagi digitalne fotografije in analize slik.

Preglednica S7.5: Ocena stroškov za gozdni genetski monitoring navadne bukve (*Fagus sylvatica* L.) v Sloveniji. Prvi interval gozdnega genetskega monitoringa (Interval: 1.) se loči od naslednjih (Interval: 1+N.). P – potrošni material; Z – storitve zunanjih izvajalcev; G – gozdar; T – tehnik; R – raziskovalec; K-D – kilometrini in dnevnice; t – čas vožnje.

Dejavnost	Interval	Raven	Material		Delo			Potni stroški			Skupaj	
			P	Z	G	T	R	stroški	K-D	t		t
			[€]	[€]	[del. ur]	[del. ur]	[del. ur]	[€]	[€]	[del. ur]	[€]	[€]
Izbira ploskve	1.	osnovna	0	0	40	0	40	1.318	240	32	520	2.077
		standardna	0	0	40	0	40	1.318	240	32	520	2.077
		napredna	0	0	40	0	40	1.318	240	32	520	2.077
	1+N.	osnovna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		standardna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		napredna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vzpostavitev ploskve	1.	osnovna	65	0	0	27	2	434	144	19	288	931
		standardna	385	0	0	48	4	798	240	32	481	1.904
		napredna	385	0	0	48	4	798	240	32	481	1.904
	1+N.	osnovna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		standardna	320	0	0	25	2	412	112	15	224	1.068
		napredna	320	0	0	25	2	412	112	15	224	1.068
Terenska opazovanja	1.	osnovna	0	0	20	20	81	2.105	1.120	84	1.469	4.694
		standardna	0	0	20	157	296	8.232	2.272	235	4.101	14.605
		napredna	0	0	20	428	454	15.281	5.224	623	10.564	31.069
	1+N.	osnovna	0	0	20	21	89	2.281	1.136	86	1.513	4.930
		standardna	0	0	20	158	272	7.801	2.288	238	4.117	14.206
		napredna	0	0	20	474	444	15.779	5.408	648	10.896	32.083
Vzorčenje	1.1+N.	osnovna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		standardna	4	0	0	18	0	262	96	13	189	551
		napredna	4	3.758	0	90	0	1.337	288	38	566	5.953
	1+N.	osnovna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		standardna	3	0	0	10	0	149	48	6	94	295
		napredna	3	3.758	0	82	0	1.225	240	32	471	5.697
Lab. analize	1.	osnovna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		standardna	2.239	0	0	26	84	1.984	0	0	0	4.222
		napredna	14.238	0	0	189	107	4.857	0	0	0	19.094
	1+N.	osnovna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		standardna	1.492	0	0	17	84	1.855	0	0	0	3.347
		napredna	13.491	0	0	181	107	4.728	0	0	0	18.219
Skupaj	1.	osnovna	65	0	60	47	123	3.857	1.504	135	2.277	7.703
		standardna	2.628	0	60	249	424	12.593	2.848	311	5.290	23.359
		napredna	14.627	3.758	60	755	605	23.591	5.992	724	12.130	60.098
	1+N.	osnovna	0	0	20	21	89	2.281	1.136	86	1.513	4.930
		standardna	1.815	0	20	210	358	10.217	2.448	259	4.436	18.916
		napredna	13.814	3.758	20	762	553	22.144	5.760	694	11.591	57.068

Preglednica S7.6: Ocena stroškov za gozdni genetski monitoring bele jelke (*Abies alba* Mill.) v Sloveniji. Prvo obdobje gozdnega genetskega monitoringa (Interval: 1.) se loči od naslednjih (Interval: 1+N.). P – potrošni material; Z – storitve zunanjih izvajalcev; G – gozdar; T – tehnik; R – raziskovalec; K-D – kilometrini in dnevnice; t – čas vožnje.

Dejavnost	Interval	Raven	Material		Delo			Potni stroški			Skupaj	
			P	Z	G	T	R	stroški	K-D	t		t
			[€]	[€]	[del. ur]	[del. ur]	[del. ur]	[€]	[€]	[del. ur]	[€]	[€]
Izbira ploskve	1.	osnovna	0	0	40	0	40	1.318	240	32	520	2.077
		standardna	0	0	40	0	40	1.318	240	32	520	2.077
		napredna	0	0	40	0	40	1.318	240	32	520	2.077
	1+N.	osnovna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		standardna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		napredna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vzpostavitev ploskve	1.	osnovna	65	0	0	27	2	434	144	19	288	931
		standardna	385	0	0	48	4	798	240	32	481	1.904
		napredna	385	0	0	48	4	798	240	32	481	1.904
	1+N.	osnovna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		standardna	320	0	0	25	2	412	112	15	224	1.068
		napredna	320	0	0	25	2	412	112	15	224	1.068
Terenska opazovanja	1.	osnovna	0	0	20	20	81	2.105	1.120	84	1.469	4.694
		standardna	0	0	20	146	292	7.986	2.080	210	3.672	13.738
		napredna	97	0	23	397	471	15.178	4.408	516	8.797	28.480
	1+N.	osnovna	0	0	20	21	89	2.281	1.136	86	1.513	4.930
		standardna	0	0	20	147	268	7.555	2.096	212	3.690	13.341
		napredna	5	0	20	421	426	14.646	4.496	528	8.917	28.064
Vzorčenje	1.1+N.	osnovna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		standardna	4	0	0	18	0	262	96	13	189	551
		napredna	4	2.074	0	98	0	1.457	288	38	566	4.389
	1+N.	osnovna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		standardna	3	0	0	10	0	149	48	6	94	295
		napredna	3	2.074	0	90	0	1.345	240	32	471	4.133
Lab. analize	1.	osnovna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		standardna	1.910	0	0	24	87	2.003	0	0	0	3.912
		napredna	12.154	0	0	178	125	5.026	0	0	0	17.180
	1+N.	osnovna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		standardna	1.273	0	0	16	87	1.885	0	0	0	3.158
		napredna	11.517	0	0	170	125	4.909	0	0	0	16.426
Skupaj	1.	osnovna	65	0	60	47	123	3.857	1.504	135	2.277	7.703
		standardna	2.299	0	60	235	423	12.365	2.656	286	4.861	22.181
		napredna	12.640	2.074	63	721	639	23.777	5.176	617	10.363	54.030
	1+N.	osnovna	0	0	20	21	89	2.281	1.136	86	1.513	4.930
		standardna	1.596	0	20	197	357	10.002	2.256	233	4.008	17.862
		napredna	11.845	2.074	20	706	553	21.311	4.848	574	9.612	49.691

Ime projekta: **LIFE for European Forest Genetic Monitoring System**
Okrajšava: **LIFEGENMON**
Program: **LIFE**
Številka pogodbe: **LIFE13 ENV/SI/000148**
Trajanje projekta: **julij 2014 – december 2020**
Kordinator projekta: **Gozdarski inštitut Slovenije**



LIFE13 ENV/SI/000148



Projekt je finančno podprt s finančnim mehanizmom Evropske unije LIFE

Projektne partnerji

SLOVENIJA

Gozdarski inštitut Slovenije
(kordinator projekta)
www.gozdis.si

Zavod za gozdove Slovenije
www.zgs.si

Center za informiranje, sodelovanje
in razvoj nevladnih organizacij
www.cnvos.si



cnvos
center za informiranje, sodelovanje
in razvoj nevladnih organizacij



NEMČIJA

Bavarski urad za gozdno genetiko
www.awg.bayern.de



Bayerisches Staatsministerium für
Ernährung, Landwirtschaft und Forsten



GRČIJA

Aristotelova univerza v Solunu
Fakulteta za gozdarstvo in naravno okolje
www.for.auth.gr

Decentralizirana uprava Makedonije in Trakije,
Generalni direktorat za
gozdarstvo in podeželje
www.damt.gov.gr



HELLENIC REPUBLIC
DECENTRALIZED ADMINISTRATION of MACEDONIA & THRACE
GENERAL DIRECTORATE of FORESTS & RURAL AFFAIRS