

GDK 165+232.3:176.1Fagus sylvatica(497.4)(045)=163.6

Identifikacija izvora gozdnega reprodukcijskega materiala bukve s pomočjo molekularnih metod

Identification of Forest Reproductive Material Origin of European Beech using Molecular Methods

Marjana WESTERGREN¹, Marko BAJC², Domen FINŽGAR³, Gregor BOŽIČ⁴, Hojka KRAIGHER⁵

Izvleček:

Westergren, M., Bajc, M., Finžgar, D., Božič, G., Kraigher, H.: Identifikacija izvora gozdnega reproduktivnega materiala bukve s pomočjo molekularnih metod; Gozdarski vestnik, 75/2017, št. 7-8. V slovenščini z izvlečkom in povzetkom v angleščini, cit. lit. 37. Jezikovni pregled angleškega besedila Breda Misja, jezikovni pregled slovenskega besedila Marjetka Šivic.

Od kakovosti in izvora gozdnega reprodukcijskega materiala (GRM) bodo odvisni genetska pestrost, struktura, preživetje in uspevanje sadik ter končno uspevanje in odpornost bodočega gozda. Zato mora Gozdarski inštitut Slovenije (GIS) na podlagi javnega pooblastila po Zakonu o gozdovih in zahtev zakonodaje o GRM preveriti njegov izvor pred izdajo glavnega spričevala ali na zahtevo inšpektorata kadarkoli v času trženja in uporabe. Uporaba molekularnih metod pripomore k vedenju o izvoru in genetski kakovosti GRM. GIS kontinuirano razvija znanje, infrastrukturo, gensko banko in molekularne baze podatkov za izvajanje opisanih testov. Zaradi suma o (načrtno) napačni navedbi izvora GRM, nabranega jeseni 2016 iz vsaj enega semenskega objekta, smo v predstavljeni študiji analizirali izvor in genetsko pestrost GRM iz štirih semenskih objektov bukve (*Fagus sylvatica* L.), v katerih je bilo seme nabrano v istem letu, ter drugih vzorcev iz Slovenske gozdne genske banke, skupaj petnajst. Za analize smo uporabili jedrne mikrosatelite, šestnajst lokusov, ki jih na GIS uporabljamo rutinsko.

S tehničnega vidika so se izbrani markerji izkazali za primerne za identifikacijo posameznikov, oceno genetske pestrosti in identifikacijo domnevnega izvora. Zaradi možnosti mešanja vzorcev, pridobljenih s tal, in tehničnih potreb bomo v prihodnosti za potrebe rekonstrukcije genotipa semenskega drevesa analizirali vsaj dvanajst semen na drevo. Genetska pestrost manjših vzorcev je bila značilno manjša od tiste v velikih vzorcih. Opozarjamo, da je GRM nujno treba nabirati najmanj z v odobritvi semenskega objekta predpisanega števila dreves, da zagotovimo ustrezno veliko genetsko pestrost GRM, ki ga sadimo v gozdove. Metode razvrščanja posameznikov na podlagi Bayesove verjetnosti in filogenetska drevesa so pravilno določili izvor referenčnih vzorcev, medtem ko je bila resolucija analize glavnih komponent manjša. Vse metode, uporabljene za identifikacijo domnevnega izvora vzorcev semena, so nedvoumno pokazale, da vzorec TURs ni bil nabran v sestoji TUR, različen je tudi od preostalega analiziranega genofonda bukve v Sloveniji.

V predstavljenem primeru so se uporabljene metode molekularne identifikacije izvora GRM izkazale kot potrebne za preprečitev vnosa neprimerne GRM v slovenske gozdove.

Ključne besede: *Fagus sylvatica*, gozdni reprodukcijski material, identifikacija izvora, genetska pestrost, mikrosateliti, analiza starševstva, Slovenija

Abstract:

Westergren, M., Bajc, M., Finžgar, D., Božič, G., Kraigher, H.: Identification of Forest Reproductive Material Origin of European Beech using Molecular Methods; Gozdarski vestnik (Professional Journal of Forestry), 75/2017, vol 7-8. In Slovenian, abstract and summary in English, lit. quot. 37. Proofreading of the English text Breda Misja, proofreading of the Slovenian text Marjetka Šivic.

Quality and origin of forest reproductive material (FRM) define the possible genetic diversity, structure, survival and development of seedlings and resilience of the future forest to stress and disturbances. The Slovenian Forestry Institute (SFI) must, based on the public authorization, in accordance to the Forest Act, The Act on Forest Reproductive Material and other legislation requirements concerning FRM, check its origin before issuing the master certificate or, on demand of the inspectorate, at any time during its marketing and use. Application of molecular methods contributes to the determination of FRM origin and its genetic quality. SFI continually develops know-how, infrastructure, gene bank, and molecular databases for performing such tests. In this study, the origin (provenance) and genetic diversity of FRM collected from four beech (*Fagus sylvatica* L.) seed stands in 2016 were analysed, resulting on the suspicion of (intentional) mislabelling of the origin of the FRM, and compared to samples stored in the Slovenian Forest Gene Bank. In total 15 samples were analysed using 16 nuclear microsatellite loci.

From the technical point of view, the selected markers proved to be appropriate for individual tree identification, evaluation of genetic diversity, and identification of the alleged origin. Due to the possible mixing of samples, for which seed was collected from the ground, and technical needs, we will analyze in the future at least 12 seeds per tree for the needs of the seed tree genotype reconstruction. Genetic diversity of smaller samples (seed collected from less seed trees) was significantly lower than that of large ones. We would like to emphasize that FRM should be collected at least from the number of trees prescribed in the decree on approval of the seed object in order to safeguard genetic diversity of FRM. Methods of clustering using Bayesian methods and phylogenetic trees correctly determined the origin of reference samples, while the resolution of the principle component analysis was lower. All methods used for identification of the alleged origin of seed samples, unambiguously proved that TURs sample was not collected in TUR seed stand, and it also differed from the rest of the analysed beech gene pool in Slovenia.

In the presented case study, the applied methods for the molecular identification of FRM origin proved to be necessary and prevented introduction of the inappropriate FRM into Slovenian forests.

Key words: *Fagus sylvatica*, forest reproductive material, identification of origin, genetic diversity, microsatellites, parentage analysis, Slovenia

1 UVOD

1 INTRODUCTION

Genetska pestrost je temelj odpornosti in prilagajanja drevesnih vrst na biotski in abiotski stres ter okoljske spremembe (Koskela in sod., 2007, Potter in sod., 2017, Fady in sod., 2016, Broadhurst in Boshier, 2014, Konnert in Hosius, 2010). Za zagotavljanje kontinuiranega razvoja drevesnih vrst in populacij je izjemno pomembno, da pri obnovi s sajenjem in setvijo omogočimo prenos genetske pestrosti, ki omogoča prilagajanje na spremembe (tj. **prilagoditvena genetska pestrost**) iz odrasle na novo generacijo. Prilagoditvena genetska pestrost namreč omogoča ohranjanje sposobnosti prilagajanja na dolgi rok, medtem ko je na kratki rok povezana z ohranjanjem reproduktivne uspešnosti (Frankham in sod., 2002). Tudi epigenetski procesi (to so procesi, ki vplivajo na različno izražanje genov, torej na različnost v končnih fenotipih iste vrste, ki pa jih ne zaznamo na ravni razlik v nukleotidnih zaporedjih (Latzel in sod., 2013)) vplivajo na preživetje, rast in razmnoževanje dreves (Skrøppa in sod., 2009, Gugger in sod., 2016), vendar je poznavanje teh procesov pri drevesih šele v povojih.

Ko obnavljamo gozd s sajenjem ali setvijo, sta genetska pestrost in struktura bodočega gozda odvisni od izvora in genetske pestrosti gozdnega reprodukcijskega materiala (GRM, na kratko so to semena, sadike, puljenke in potaknjenci). Genetska sestava GRM pa je odvisna od genetske sestave odraslega, tj. semenskega sestoja (Konnert in Hosius, 2010) in kompleksnih vplivov na opraševanje, oploditev, dozorevanje semena (pri semenskem materialu) in rast mladja (pri GRM, ki vključuje puljenke ali dele rastlin). V času hitrih podnebnih sprememb je izbor primerne GRM še posebno pomemben (Konnert in sod., 2015). Ovrednotenje prilagoditvene genetske pestrosti ni enostavno in velikokrat kot njen približek uporabljamo nevtralno genetsko pestrost. Nevtralna genetska pestrost se ne izraža neposredno v prilagoditveni sposobnosti vrste, omogoča pa vpogled v pretok genov med generacijami. Na enostaven način jo ugotovimo z različnimi molekularnimi analizami rastlinskega tkiva v laboratoriju. Pogosto analiziramo mikrosatelite, to so kratki, ponavljajoči se deli DNA, ki so sestavljeni iz več kopij kratkih, 2–5 baznih parov dolgih ponovitev. Ker se število ponovitev deduje in je pri isti vrsti število ponovi-

¹ Dr. M. W., Gozdarski inštitut Slovenije. Večna pot 2, SI-1000 Ljubljana, Slovenija. marjana.westergren@gozdis.si

² M. B., Gozdarski inštitut Slovenije. Večna pot 2, SI-1000 Ljubljana, Slovenija. marko.bajc@gozdis.si

³ D. F., Gozdarski inštitut Slovenije. Večna pot 2, SI-1000 Ljubljana, Slovenija. domen.finzgar@gozdis.si

⁴ Dr. G. B., Gozdarski inštitut Slovenije. Večna pot 2, SI-1000 Ljubljana, Slovenija. gregor.bozic@gozdis.si

⁵ Prof. dr. H. K., Gozdarski inštitut Slovenije. Večna pot 2, SI-1000 Ljubljana, Slovenija. hojka.kraigher@gozdis.si

tev lahko različno, te razlike pomagajo ocenjevati nevtralno genetsko pestrost (Jump in sod., 2009, Westergren in sod., 2012). Molekularne metode so v vse večji meri v rabi za kontrolo genetske kakovosti in ustreznosti GRM (Konnert in Behm, 2006, Konnert in Hosius, 2010).

Pridelavo in uporabo kakovostnega, genetsko pestrega in rastišču prilagojenega GRM uravnava Zakon o gozdnem reprodukcijskem materialu (2002) in podrejeni predpisi. Pred odobritvijo vsak gozdni semenski objekt pregleda strokovna komisija, ki pripravi smernice za nego objekta in pridobivanje GRM. Pridobivanje, dodelava in trženje GRM so dokumentirani preko z evropsko direktivo (EC/105/1999) predpisane »papirnate kontrole«, ki zagotavlja sledljivost od nabiranja do ponovnega sajenja GRM v gozd. Uporaba molekularnih in biokemijskih markerjev povečuje zmožnost sistema kontrole in se s pridom uporablja pri kontroli izvora in genetske kakovosti GRM (Finkeldey in sod., 2010, Konnert in Behm, 2006). Primeri prostovoljnih sistemov, ko je lastnik pripravljen plačati višjo ceno sadike za zagotovitev njenega izvora in kakovosti, sta nemški Züf (<http://www.zuef-forstpflanzen.de/>) in FfV (<http://isogen.de/en/>). Sistem temelji na primerjavi vzorcev dreves, semena in sadik, ki jih odvzame nevtralna oseba na različnih stopnjah od odobritve semenskega objekta do prodaje/sajenja sadik v gozd z uporabo molekularnih in biokemijskih markerjev.

V Sloveniji ob nabiranju GRM v semenskih objektih zakonodaja predpisuje odvzem tkiva z vseh dreves, s katerih nabiramo seme oz. seme/plodove s posameznega drevesa, ki jih je treba dostaviti na Gozdarski inštitut Slovenije (GIS) (Pravilnik o spremembah ... 2012). Vzorci so namenjeni za potrebe molekularne identifikacije v dokumentaciji navedenega izvora in genetske pestrosti GRM, ki jih v okviru certifikacije GRM lahko opravlja za certifikacijo pooblaščen organ (GIS).

Na podlagi nedoslednih navedb o količini semena v posameznih semenskih objektih je obstajal za vsaj en semenski objekt sum, da seme ni bilo nabrano v njem, kljub deklariranim navedbam semenarja. Tak sum mora GIS kot pooblaščen organ za certifikacijo GRM preveriti na podlagi javnega pooblastila po Zakonu o gozdovih in zahtev zakonodaje o GRM. V predstavljeni študiji smo

zato z molekularnimi metodami analizirali izvor in genetsko pestrost GRM iz štirih semenskih objektov bukve (*Fagus sylvatica* L.), v katerih je bilo seme nabrano jeseni 2016. Izvor semena in genetsko pestrost smo umerili z vzorci populacij bukve v Sloveniji, ki jih hranimo v Slovenski gozdni genski banki. Za analize smo uporabili jedrne mikrosatelite (t.j. dele DNA, ki so v jedrih drevesnih celic), večinoma selektivno nevtralne markerje, ki so zelo variabilni in se rutinsko uporabljajo v forenziki (npr. pri identifikaciji posameznih dreves zaradi ilegalne sečnje, kjer se v laboratoriju primerja genotipe zaseženene hlodovine ali primarnih izdelkov iz lesa z genotipi panjev z mesta poseka), kjer funkcija genetske variacije ni pomembna (npr. Jan in Fumagalli, 2016, Miller in sod., 2014, Eurlings in sod., 2010, pregled uporabnosti molekularnih orodij za identifikacijo za drevesa je predstavljen v Finkeldey in sod., 2010). Rezultati raziskave potrjujejo uporabnost mikrosatelitov za ugotavljanje izvora GRM in hkrati zanesljivo prikazujejo konkretne nepravilnosti.

2 METODE

2 METHODS

2.1 Vzorčenje

2.1 Sampling

Vzorci, ki smo jih preiskovali v predstavljeni študiji so vključevali seme bukve, ki so ga semenarji nabrali s tal pod posameznimi drevesi, partije nabranega semena ter tkivo posameznih semenskih dreves (listi, popki). Osebe GIS je v semenskih sestojih BLE, POK in TUR nabralo vzorce semenskih dreves (listi, popki), ki so služili kot referenčni material za preverjanje izvora semena, ki so ga nabrali semenari. V analize so bili vključeni tudi vzorci dreves iz Slovenske gozdne genske banke, in sicer iz sestojev Rajhenavski rog (RR), Osankarica (OS), Abitanti (ABI) in Kamenski hrib (KH), ki so služili kot pozitivne kontrole v okviru populacijsko genetskih analiz; iz sestojev Rajhenavski Rog in Osankarica smo vključili razvojni fazi debeljak (S) in mladje (M) za kontrolo razpona variacije med različnimi generacijami znotraj istega sestoja. Dodatno smo vzorčili tudi posamezna drevesa iz bližine poseljenih površin na transektu med Kamnikom

Preglednica 1: Analizirani vzorci za določitev izvora semena

Table 1: List of samples used in the analysis

Vzorec*	Tip vzorca	Število vzorcev (št. dreves, pod katerimi je bilo nabrano seme po navedbi semenarja)	Nabiralec	Odobren gozdni semenski objekt
ABI (Abitanti)	drevesa	39	GIS	ne
BLE (Blegoš)	drevesa	6	GIS	da
BLEs (Blegoš)	seme, nabrano pod posameznim drevesom	127 (17)	semenar	da, domnevno
GORp (Gorjanci)	partija semena	30	semenar	da, domnevno
GORs (Gorjanci)	seme, nabrano pod posameznim drevesom	149 (25)	semenar	da, domnevno
KAM (posamezna drevesa med Kamnikom in Ljubljano)	drevesa	32	GIS	ne
KH (Kamenski hrib)	drevesa	35	GIS	ne
OS-M (Osankarica)	drevesa – mladje	35	GIS	da
OS-S (Osankarica)	drevesa – odrasla	35	GIS	da
POK (Poklarija)	drevesa	40	GIS	da
POKs (Poklarija)	seme, nabrano pod posameznim drevesom	72 (10)	semenar	da, domnevno
RR-M (Rajhenavski Rog)	drevesa	35	GIS	ne
RR-S (Rajhenavski Rog)	drevesa	35	GIS	ne
TUR (Turje)	drevesa	40	GIS	da
TURs (Turje)	seme nabrano pod posameznim drevesom	54 (9)	semenar	da, domnevno

* Vzorci z isto oznako (velike tiskane črke) naj bi bili nabrani v istem sestoju. Identifikacijske številke semenskih objektov so namenoma izpuščene.

in Ljubljano z namenom, da v Slovensko gozdno genosko banko in analize preverjanja ustreznosti nabranega semena vključimo tudi vzorce dreves, ki se zaradi njihove dostopnosti in pogosto dobrega obroda morebiti nepravilno uporabljajo za pridobivanje GRM. Podrobnosti o vzorcih, nabranih v posameznih sestojih, so navedene v preglednici 1.

2.2 Molekularne analize

2.2 Molecular analysis

Iz vzorčenih liofiliziranih tkiv (popki, seme) smo izolirali DNA, ki smo jo pomnožili v treh multipleksnih reakcijah PCR na skupaj šestnajstih mikrosatelitnih lokusih, ki so jih opisali Lefèvre in sod. (2012). Pomnožke smo analizirali s pomočjo kapilarne elektroforeze na genetskem analizatorju ABI 3500 (Applied biosystems / Thermo Fisher Scientific). Vsi navedeni postopki, kemikalije in markerji se v molekularnem laboratoriju GIS uporabljajo rutinsko in so podrobno opisani v standardnih operativnih postopkih SOP FIGE LIO-PLANT_v1.1, SOP FIGE DNA EXTR LIO PLANT_v1.1, SOP FIGE DNA -80°C, SOP FIGE PCR_v1.2 in SOP FIGE FA_v1.0.

V primeru analize semena smo seme skalili na filter papirju in DNA izolirali iz klice. V nadaljevanju se rezultati analize semena nanašajo na klice, vzgojene iz posameznega semena.

Genotipizacijo smo izvedli s programom GeneMapper 5.0 (Applied Biosystems / Thermo Fisher Scientific), populacijsko genetske analize pa z različnimi prosto dostopnimi in široko uporabljenimi programi, kot je navedeno spodaj. Kakovost uporabljenih markerjev (prisotnost vezavnega neravnovesja in ničelnih alelov) smo preverili s programom Genepop 4 (Rousset, 2008), njihovo primernost za identifikacijo posameznikov pa preko izračuna verjetnosti identitete (P_{ID}), kot je implementirano v programu GenALEx 6.5 (Peakall in Smouse, 2012).

2.3 Identifikacija genotipa materinskega drevesa – število dreves, s katerih je bilo pridobljeno seme

2.3 Identification of maternal genotypes – number of trees for seed collection

Z analizo semen, ki naj bi bila pridobljena z istega semenskega drevesa (seme je bilo nabrano

pod posameznim semenskim drevesom, vendar prisotnost semena s sosednjih dreves ni bila izključena), smo želeli preveriti, s koliko dreves je bilo seme dejansko nabrano. Preverjanje trditve, da so semena pripadala istemu drevesu, je potekalo na podlagi treh Mendlovih zakonov kodominantnega dedovanja:

- 1) alel lahko izhaja od matere samo, če obstaja drugi alel, ki je prisoten vedno, ko je prvi alel odsoten,
- 2) alel, ki je prisoten v homozigotnem stanju pri vsaj enem potomcu, mora biti prisoten pri materi,
- 3) če sta med potomci dva različna homozigota, noben drug alel ne more izhajati od matere.

Dejstvo, da vsi potomci (klice) ne izhajajo iz istega drevesa, je moralo biti nedvoumno dokazano na vsaj dveh lokusih, da smo vzorec šteli kot vzorec, ki ni izhajal z istega drevesa.

2.4 Genetska pestrost v odvisnosti od velikosti vzorca

2.4 Genetic diversity in association with the sample size

Zaradi različnega števila analiziranih osebkov na vzorec smo za izračun genetske pestrosti uporabili kazalnik "pestrost alelov", ki je standardiziran na najmanjše število alelov v vzorcu. V našem primeru znaša ta vrednost 60, tj. 30 osebkov * 2 alela na osebek. Analiza je bila narejena s programom SpaGeDi (Hardy in Vekemans, 2002). Populacija BLE je bila izvzeta zaradi majhnega vzorca (6 dreves) iz analize genetske pestrosti.

S Pearsonovim testom v R (Development Core Team 2016) smo preverili, ali obstaja korelacija med velikostjo vzorca in genetsko pestrostjo. Velikost vzorca za vzorce semena, nabranega pod posameznimi drevesi, je bila ekvivalentna številu materinskih dreves, s katerih naj bi seme izhajalo (preglednica 1).

2.5 Genetska struktura – identifikacija izvora vzorcev

2.5 Genetic structure – identification of the sample origin

Genetsko strukturo oziroma izvor populacij smo analizirali na tri različne načine: i) z algoritmom razvrščanja posameznih osebkov na podlagi Bayesove verjetnosti v programu Structure 2.3.4

(Pritchard in sod., 2000; Falush in sod., 2003; Hubisz in sod., 2009), ii) z izračunom filogenetskih dreves v programu Poptree2 (Takezaki in sod., 2010) in iii) z analizo glavnih komponent (PCA) v programu GenAEx.

V programu Structure smo za identifikacijo genetske strukture uporabili model mešanja v kombinaciji z modelom koreliranih frekvenc ob predhodni informaciji ob apriori identificiranem izvoru vzorca. Število skupin K za izračune se je gibalo med 1 in 10, za vsak K smo opravili pet ponovitev. Število korakov za učenje je bilo 150.000 in število ponovitev 200.000. Najverjetnejše število skupin K smo določili s pomočjo Evannove metode (Evanno in sod. 2005) s Structure Harvesterjem (Earl in von Holdt, 2012). Povprečje ponovitev smo izračunali in rezultate vizualizirali s pomočjo programa CLUMPAK (Kopelman in sod., 2015).

Filogenetska drevesa, ki so temeljila na frekvenci alelov v posameznem vzorcu, smo izračunali s programom Poptree2. Podporo stičiščem smo testirali s 5000 permutacijami. Uporabljene so bile genetske razdalje D_{ST} in F_{ST} , izračunane v istem programu, ter način izdelave dreves z metodo UPGMA (»unweighted pair-group method with arithmetic mean«) in NJ (»neighbour joining«, metoda povezovanja najbolj podobnih sosedov). Analiza PCA je bila narejena na podlagi matrike povprečnih genotipskih razdalj med pari vzorcev. Genotipske parne razdalje in analiza PCA so bile opravljene z algoritmi, implementiranimi v programu GenAEx.

Med analiziranimi vzorci so bili referenčni vzorci nabrani v istem sestoju (OS-S in OS-M ter RR-S in RR-M) z odraslih dreves in mladja.

Vzorci so služili kot kontrola razpona variacije med različnimi generacijami znotraj istega sestoja.

3 REZULTATI

3 RESULTS

Z vidika kakovosti so se vsi lokusi izkazali kot primerni za nadaljnje analize. Deleži ničelnih alelov na lokus in populacijo so se za 0,88 kombinacij vzorec-lokus gibali pod 0,05 in so bili le v treh primerih (vsi v vzorcu BLE, ki je vseboval le šest dreves) višji od 0,10. Kasneje je bil vzorec BLE izvzet iz analiz genetske pestrosti. Ničelno hipotezo o neodvisnosti genotipov med dvema lokusoma v posameznem vzorcu smo zavrnila za 12 kombinacij od 1800 ($P < 0,05$, upoštevana Bonferonijeva korekcija p vrednosti).

3.1 Identifikacija genotipa materinskega drevesa – število dreves, s katerih je bilo nabrano seme

3.1 Identification of maternal genotypes – number of trees for seed collection

Markerji so se izkazali primerni za identifikacijo posameznikov. P_{ID} , tj. verjetnost, da imata dva naključno izbrana posameznika identičen genotip, ob upoštevanju, da smo lahko vzorčili sorodna drevesa in seme, je bila velikostnega reda 10^{-6} . To pomeni, da v bi v 1.000.000 analiziranih vzorcih z uporabljenim naborom markerjev teoretično našli en multilokusni genotip, ki bi si ga delila dva vzorca in ju posledično ne bi mogli razlikovati.

V vseh štirih vzorcih, kjer smo imeli na voljo seme, nabrano izpod posameznih dreves, je bil delež semen, vezanih na posamezno drevo, ki pa

Preglednica 2: Rezultati analize vzorcev semena, vezanega na posamezno drevo

Table 2: Results of samples attributed to an individual maternal tree

Provenienca	Število semenskih dreves po navedbi semenarja	Število analiziranih semen na semensko drevo	Delež vzorcev semen, ki so vsebovali seme iz vsaj dveh različnih semenskih dreves [%]
GORs	25	5 – 6	52
TURs	9	6	56
BLEs	17	6 – 11	65
POKs	10	6	100

niso izhajala z istega semenskega drevesa, večji od polovice (preglednica 2). Na primer, v vzorcu BLEs, kjer naj bi bilo seme nabrano izpod domnevno sedemnajstih semenskih dreves, je kar enajst podvzorcev semen (65%) vsebovalo seme, ki je brez dvoma pripadalo vsaj dvema semenskima drevesoma. To pomeni, da v 65 % primerov vsaj dve izmed 6–11 analiziranih semen, nabranih pod posameznim drevesom, nista pripadali istemu semenskemu drevesu.

Če je podvzorec po izključitvi semen, ki niso pripadala istemu semenjaku, vseboval premalo semen (večinoma pod pet ali šest), nedvoumna rekonstrukcija genotipa semenskega drevesa na vseh lokusih ni bila mogoča. Nadaljnje analize za vzorce iz preglednice 2 zato temeljijo na frekvencah alelov semen.

3.2 Genetska pestrost v odvisnosti od velikosti vzorca

3.2 Genetic diversity in association with the sample size

Najmanjšo genetsko pestrost izkazujeta vzorca POKs in TURs (slika 1). Oba vzorca sta vsebovala seme, nabrano izpod desetih in devetih

posameznih dreves, po šest semen na domnevno semensko drevo (preglednica 2).

Med velikostjo vzorca in genetsko pestrostjo je bila statistično značilna ($p = 0,014$) in zmerne pozitivna korelacija ($r = 0,638$). Torej: z več dreves nabiramo seme, večji del dejanske genetske pestrosti bomo zajeli pri pridobivanju semena.

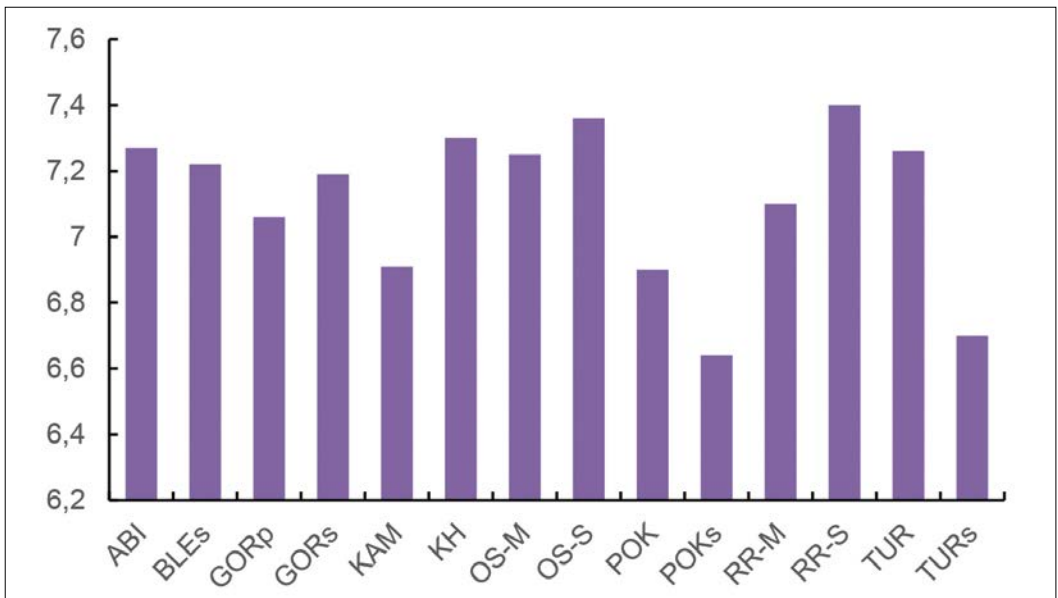
3.3 Genetska struktura – identifikacija izvora vzorcev

3.3 Genetic structure – identification of the sample origin

Najverjetnejše število genetskih skupin K , identificiranih z algoritmom razvrščanja posameznih osebkov na podlagi Bayesove verjetnosti, je tri. Sledi rešitev s $K = 7$. V nadaljevanju sta predstavljeni obe najverjetnejši rešitvi za povprečne vrednosti na vzorec (slika 2) ter za vsak posamezni analizirani osebek (slika 3).

Rezultate lahko povzamemo z naslednjimi trditvami:

- metoda razvrščanja posameznih osebkov na podlagi Bayesove verjetnosti je kot identične uvrstila referenčne vzorce dreves in mladja iz



Slika 1: Genetska pestrost, izražena kot "pestrost alelov", ki je standardizirana na najmanjše število alelov na vzorec v celotni analizi, tj. 60.

Figure 1: Allelic richness, standardised to the smallest analysed sample, i.e. 60 alleles

istega sestoja (OS-M in OS-S ter RR-M in RR-S);

- vzorec TURs (vzorci semena, vezani na posamezna drevesa) ne izhaja iz iste populacije kot vzorec TUR (vzorčena odrasla drevesa v semenskem sestoji), kar je razvidno za $K = 3$ in $K = 7$;
- vzorca BLE in BLEs najverjetneje izhajata iz iste populacije, kar je razvidno za $K = 3$. Za $K = 7$ bi del osebkov v vzorcu BLEs lahko pripadal ločeni genetski skupini;

- vzorca GORs in GORp najverjetneje izhajata iz iste populacije, kar je razvidno za $K = 3$. Za $K = 7$ se podpora trditvi zmanjša;
- Vzorca GORp in POKs najverjetneje izhajata iz iste populacije;
- Vzorca POK in POKs najverjetneje ne izhajata iz iste populacije, kar je razvidno za $K = 3$ in $K = 7$. Pri $K = 3$ je razlika v deležu povprečnega genoma v populaciji v skupini K1 in K2 0.35. To je petkrat več kot razlika v povprečnem deležu genoma v populacijah RR in OS, kjer



Slika 2: Genetske skupine, ugotovljene s programom Structure za najverjetnejše rešitve $K = 3$ (zgoraj) in $K = 7$ (spodaj); predstavljene so povprečne vrednosti v posamezni genetski skupini za vsak vzorec (kode vzorcev so v preglednici 1)

Figure 2: Genetic groups based on population averages identified by Structure for the most probable solutions according to Evanno's method, $K = 3$ (above) and $K = 7$ (below). Sample codes are as in Table 1.

razlika med genetskima skupinama (odrasla drevesa in mladje) ni preseгла 0,07. Neskladje je še bolj očitno pri rešitvi $K = 7$ za deleže genoma, ki pripadajo genetskim skupinam K2, K4 in K7.

Rezultati izrisa filogenetskih dreves na podlagi genetske razdalje D_{ST} v kombinaciji z algoritmom UPGMA in NJ so prikazani na sliki 3. Rezultati na podlagi razdalje F_{ST} niso prikazani, saj so bili v okviru iste metode (UPGMA, NJ) identični tistim z razdaljo D_{ST} . Razlika je bila le v podpori razmejitvam, ki so se razlikovale do 3 %. Rezultati analize so tako kot algoritem razvrščanja posameznih osebkov na podlagi Bayesove verjetnosti uvrstili referenčne vzorce odraslih dreves in mladja iz istega sestoja v isti sestoj. Nadalje sta obe metodi izračuna filogenetskih dreves vzorec TURs identificirali kot vzorec, ki najbolj odstopa ne le od vzorca TUR, ki naj bi bil iz istega sestoja, temveč tudi od preostalih vzorcev v analizi. Rezultat je skladen z rezultatom algoritma razvrščanja posameznih osebkov na podlagi Bayesove verjetnosti. Dodatne ugotovitve, ki jih nakazuje izris filogenetskih dreves, so:

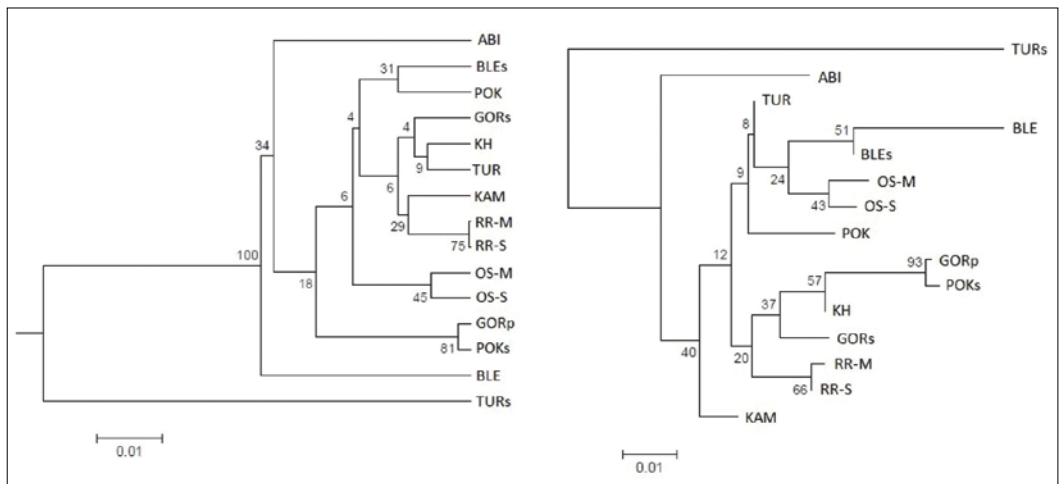
- NJ uvrsti vzorca BLE in BLEs v isto populacijo, UPGMA ne,
- vzorca GORs in GORp NJ uvrsti v isto skupino skupaj z vzorcem POKs, medtem ko vzorec POK uvrsti v drugo skupino,

- vzorca GORp in POKs najverjetneje izhajata iz iste populacije (več kot 80 % podpora trditvi). Z analizo PCA smo na prvi osi razložili 29 %, na prvih dveh oseh 56 % in prvih treh oseh 68 % variabilnosti. Vzorec TURs se jasno loči od preostalih populacij (slika 4).

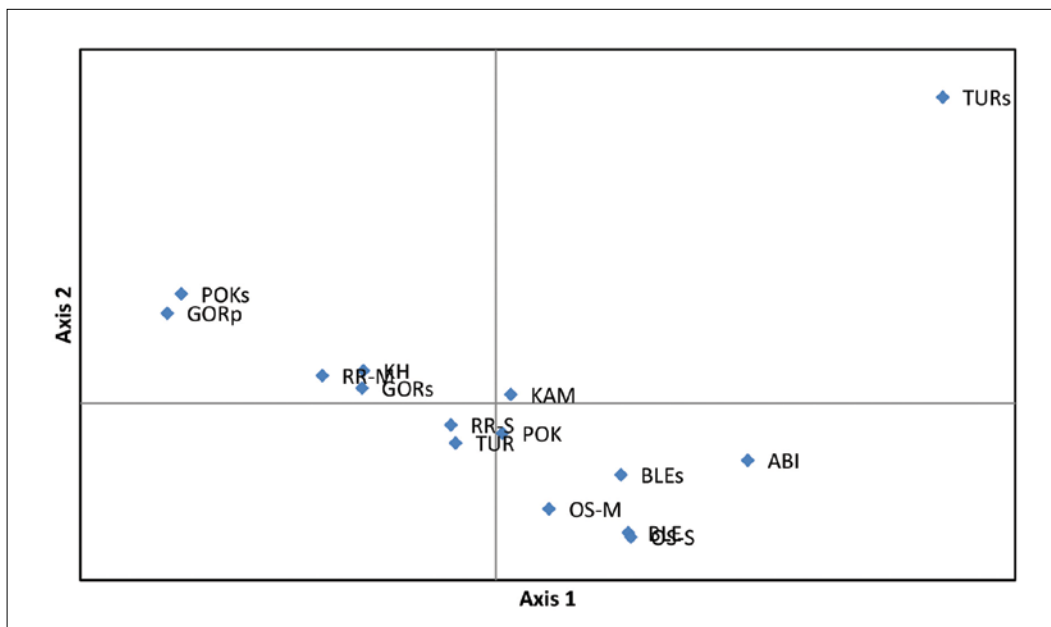
4 RAZPRAVA IN ZAKLJUČKI

4 DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Kakovosten GRM primerne izvora je izjemno pomemben pri obnovi s sajenjem ali setvijo. Od njega bodo odvisne genetska pestrost, struktura in prilagoditvena sposobnost bodočega gozda. Izvor GRM je izjemno pomemben za preživetje in uspevanje sadik v določenem okolju (Finkeldey in sod., 2010); neprimeren izvor GRM lahko privede do upočasnjene rasti ali pa uničenja gozda v ujmah, kot je razvidno iz provenienčnega poskusa bukve na Kamenskem hribu pri Novem mestu (Westergren in sod., 2017). Zato večina držav v Evropi uravnava pridobivanje in trženje GRM. Uporaba molekularnih metod pripomore k vedenju o izvoru in genetski kakovosti GRM. Z njimi lahko preverimo, ali seme resnično prihaja iz sestoja, navedenega v dokumentaciji. Na GIS v skladu z Zakonom o gozdnem reprodukcijskem materialu (2002) in podrejenimi predpisi hranimo referenčne vzorce z vsakega drevesa, s katerega se nabira seme za uporabo v gozdarstvu. Hkrati



Slika 3: Filogenetska drevesa na podlagi popravljene standardne genetske razdalje D_{ST} . Levo UPGMA, desno NJ.
Figure 3: Phylogenetic trees based on standard genetic distance D_{ST} . Left UPGMA, right NJ.



Slika 4: Rezultati analize PCA

Figure 4: Results of the PCA analysis

Preglednica 3: Primerjava rezultatov identifikacije izvora vzorcev semena, ugotovljenih z različnimi metodami. +, identičen izvor; -, različen izvor; /, nezadostna resolucija

Table 3: Comparison of the results of identification of origin obtained using different methods. + identical result; - different result; / indistinct resolution

	Algoritem razvrščanja posameznih osebkov na podlagi Bayesove verjetnosti		Filogenetska drevesa (delež podpore razmejitvi)		PCA
	K = 3	K = 7	UPGMA	NJ	
OS-S in OS-M*	+	+	+ (0,45)	+ (0,43)	/
RR-S in RR-M*	+	+	+ (0,75)	+ (0,66)	/
BLE in BLEs	+	+	-	+ (0,51)	/
GORp in GORs	+	+	-	-	/
POK in POKs	-	-	-	-	/
TUR in TURs	-	-	-	-	-
POKs in GORp	+	+	+ (0,81)	+ (0,93)	+

*Referenčni vzorci

tudi sami vzorčimo drevesa iz semenskih sestojev za potrebe analize genetske kakovosti semenskih sestojev in preverjanja izvora referenčnih vzorcev ter partij semena. Ideja, na kateri temelji preverjanje izvora z molekularnimi metodami, je podobnost. Vzorci iz istega sestoja si morajo biti bolj podobni, kot so si vzorci iz različnih sestojev. Torej: imeti morajo bolj podobno genetsko sestavo, kar se izraža v merah genetske diferenciacije (Konnert in Behm, 2006).

S tehničnega vidika so se izbrani markerji (mikrosateliti) izkazali za primerne za identifikacijo posameznikov – semenskih dreves, oceno genetske pestrosti in identifikacijo domnevnega izvora. Slednje smo preverili/umerili na referenčnih vzorcih semenskih dreves in mladja v istih sestojih, v semenskem sestoju Osankarica in pragozdnem rezervatu Rajhenavski Rog.

Namen analize semena s posameznega drevesa je bil preveriti navedeno število dreves, s katerih naj bi bilo nabrano seme. Za bukev zakonodaja navaja, da je treba za vsako drevo, s katerega se seme nabira, dostaviti ali tri žive popke ali živo vejico ali tri izvrtke kambija ali dvajset žirov. Z analizo teh vzorcev ob P_{ID} vrednosti 10^{-6} oz. 10^{-15} , kolikor je le-ta znašala za nesorodna drevesa (zadostno razdaljo med semenskimi drevesi moramo ohranjati tudi pri nabiranju GRM), bi lahko z veliko verjetnostjo določili pravilno število dreves, s katerih je bilo seme nabrano. Na voljo smo imeli 10–20 uporabnih žirov na vzorec (nekateri so bili manjši od predpisanih, ker je bilo seme gluho in zato neuporabno za genetske analize), od katerih smo jih z molekularnimi metodami analizirali od pet do enajst na vzorec. Izkazalo se je, da veliko semen ni pripadalo semenskemu drevesu, kar je pričakovati pri nabiranju semen s tal. Kontaminacije vzorcev želoda, nabranih s tal, so v 67 % vzorcev opazili tudi Lexer in sod. (1999). Zato po odstranitvi genotipov semen, ki nedvoumno niso pripadali semenskemu drevesu, genotipa slednjega nismo mogli vedno uspešno rekonstruirati ter posledično določiti števila dreves, s katerih je bilo seme nabrano. Iz istega razloga lahko sklepamo, da je bilo semenskih dreves dejansko več od deklariranih, vendar pa je bila medsebojna razdalja med temi semenskimi drevesi najverjetneje manjša od priporočene.

Jones in sod. (2010) v pregledu analiz starševstva navajajo, da je za rekonstrukcijo starševskega genotipa treba analizirati 8–10 osebkov (semen), kar smo opazili tudi sami. V prihodnosti bomo zato morali za vzorce semena, nabranega s tal, analizirati vsaj dvanajst semen, bolje petnajst (glede na obstoječi Pravilnik o potrilih in glavnih spričevalih za gozdni reprodukcijski material (2004, 2012) v vsakem primeru GIS prejme po dvajset semen bukve (ali živo vejico s po tremi popki), vendar gluhega semena, ki ga je bilo v obravnavanih vzorčenjih veliko, ni mogoče uporabiti za analizo; dodatna omejitev števila analiziranih semen je finančna konstrukcija nalog javne gozdarske službe), da bomo lahko genotip semenjaka dejansko rekonstruirali ob predpostavki, da tretjina semen ne bo pripadala deklariranemu semenskemu drevesu.

Po pričakovanjih je bila genetska pestrost manjših vzorcev manjša kot v velikih; asociacija je bila zmerne velikostnega ranga in statistično značilna. V praksi to pomeni, da pri pridobivanju semena z več dreves zajamemo oziroma pri pridobivanju ohranimo tudi večji del genetske pestrosti in le-to posledično s sajenjem sadik, vzgojenih iz tega semena, tudi ponovno vnesemo v gozd. Opozarjamo, da je izjemno pomembno pridobivati seme najmanj iz minimalno predpisanega števila semenjakov, ki so med seboj oddaljeni vsaj eno do dve drevesni višini, da bi se izognili nabiranju semena sorodnih dreves.

Metode razvrščanja posameznikov na podlagi Bayesove verjetnosti in filogenetska drevesa, slednje s podporo od 43 do 75 %, so pravilno določile izvor referenčnih vzorcev, medtem ko je bila resolucija analize glavnih komponent manjša. Vse metode temeljijo na analizi porazdelitve frekvenc alelov v posameznem vzorcu in njihove primerjave.

Vse različne metode, uporabljene za identifikacijo domnevnega izvora vzorcev semena, so nedvoumno pokazale, da vzorec TURs ni bil nabran v sestoju TUR. Vzorec TURs se bistveno in nedvoumno razlikuje tudi od vseh drugih analiziranih vzorcev iz Slovenije. Obstaja možnost, da GRM iz vzorca TURs ne izhaja iz Slovenije, da gre za neko neznano doslej še neanalizirano populacijo bukve, ki je genetsko izrazito različna od tistih doslej analiziranih v petih od sedmih

provenienčnih območij, ali pa gre celo za seme, nabrano iz različnih parkovnih dreves.

Dve metodi vzorca POK in POKs ne uvrščata v isti sestoj, medtem ko je resolucija PCA premajhna. Po drugi strani pa za vzorca POKs (seme s posameznih semenjakov) in GORp (partija semena) z vsemi metodami in veliko stopnjo zaupanja pri filogenetskih drevesih (81 - 93%) ugotovljamo, da prihajata iz istega sestoja.

Za skupni izvor vzorcev GORp in GORs ni konsenza med metodo na podlagi Bayesove verjetnosti in filogenetskimi drevesi, medtem ko odstopanje rezultatov analize pri metodi UPGMA za vzorca BLE in BLEs lahko razložimo z majhno velikostjo vzorca BLE, v katerem so bili tudi ničelni aleli v zmerno velikem deležu, kar bi lahko vplivalo na rezultate analize.

Za partiji GRM, ki sta bili povezani z vzorcema TURs in POKs, je bila izdaja glavnega spričevala z odločbo zavrnjena takoj po prejetju vzorcev na podlagi neskladja med številom dreves v usmeritvah iz odločbe o odobritvi gozdnega semenškega objekta in premalo deklariranimi drevesi, s katerih je bilo pridobljeno seme (9 za TURs in 10 za POKs). Hkrati pa seme iz sestoja POK ni bilo pridobljeno pod nadzorom ZGS. Četudi bi bilo seme nabrano z ustreznega števila dreves, glavnega spričevala za seme iz sestojev POK in TUR ne bi izdali, saj so genetske analize jasno pokazale, da seme ne izhaja iz deklariranih sestojev.

Velika genetska pestrost znotraj populacij in majhna variabilnost med populacijami dreves oz. odsotnost varietet in ras tehnično otežujejo identifikacijo domnevnega izvora GRM. Po drugi strani pa so čas in število postopkov od nabiranja, preko dodelave in manipulacije GRM ter transporta sadik na mesto sajenja izzivi za vodenje in nadzor evidenc. Hkrati so znani tudi primeri namerno napačno označenega izvora GRM, posebno kadar v določenih regijah ni na voljo primerne GRM ali pa prevladajo finančni razlogi (Finkeldey in sod., 2010). Slednje je zelo verjetno botrovalo tudi napačnim oznakam partij semena z oznakama TURs in POKs. Opozarjamo, da zakonodaja za kršitve označevanja (t.j. trženje GRM ki ne ustreza podatkom na dokumentu) za pravno osebo ali samostojnega podjetnika posameznika predvideva kazni v višini od 1.200 evrov do 42.000 evrov, za

odgovorno osebo pravne osebe od 600 evrov do 2.000 evrov, za posameznika pa od 400 evrov do 800 evrov (Zakon o gozdnem reprodukcijskem materialu, 2002, 2004, 2011). Molekularne metode, ki omogočajo identifikacijo oziroma potrditev navedenega izvora GRM, izboljšajo kontrolo izvora in kakovosti GRM in prispevajo k odpornejšemu gozdu v prihodnosti. Gozdarski inštitut Slovenije ima znanje, opremo in mandat za opravljanje takih testov, ki so se v predstavljenem primeru izkazali kot potrebni in preprečili vnos neprimerne GRM v slovenske gozdove.

5 POVZETEK

Od kakovosti in izvora GRM bodo odvisni genetska pestrost, struktura, preživetje in uspevanje sadik ter končno uspevanje in odpornost bodočega gozda. Uporaba molekularnih metod pripomore k poznavanju in nadzoru izvora ter genetske kakovosti GRM. Z njimi lahko preverimo, ali seme resnično prihaja iz sestoja, navedenega v dokumentaciji. V skladu z Zakonom o gozdnem reprodukcijskem materialu (2002) in podrejenimi predpisi na GIS hranimo referenčne vzorce z vsakega drevesa, s katerega se pridobiva semenski material za uporabo v gozdarstvu za analize izvora GRM ter vzorce za druge analize.

V predstavljeni študiji smo analizirali izvor in genetsko pestrost GRM iz štirih semenskih objektov bukve (*Fagus sylvatica* L.), v katerih je bilo seme nabrano jeseni 2016 zaradi suma o (načrtno) napačni navedbi izvora GRM. Določiti smo želeli tudi število semenjakov, s katerih je bilo seme nabrano. Za analize smo uporabili jedrne mikrosatelite, ki so zelo variabilni in jih rutinsko uporabljamo v Laboratoriju za gozdno genetiko GIS.

S tehničnega vidika so se izbrani markerji izkazali za primerne za identifikacijo posameznikov – semenskih dreves, oceno genetske pestrosti in identifikacijo domnevnega izvora. Slednje smo preverili/umerili na referenčnih vzorcih semenskih dreves in mladja, pridobljenih v istih sestojih, shranjenih v Slovenski gozdni genski banki. Izkazalo se je, da veliko s tal nabranih semen v posameznem vzorcu ni pripadalo navedenemu semenskemu drevesu, kar je pri nabiranju semen s tal pričakovano. Zato po odstranitvi genotipov

semen, ki niso pripadali semenskemu drevesu, genotipa slednjega nismo mogli vedno uspešno rekonstruirati. Posledično nismo mogli določiti števila dreves, s katerih je bilo seme nabrano. Za uspešno rekonstrukcijo genotipa drevesa iz semena Jones in sod. (2010) priporočajo analizo 8–10 osebkov (semen), kar smo opazili tudi sami. V prihodnosti bomo zato morali za vzorce semena, nabranega s tal, analizirati vsaj dvanajst (živih) semen na deklarirano drevo, da bomo lahko dejansko rekonstruirali genotip semenjaka. Po pričakovanjih je bila genetska pestrost manjših vzorcev manjša od tiste v velikih vzorcih; asociacija je bila zmerna in statistično značilna. To pomeni, da z več dreves kot nabiramo seme, večji del genetske pestrosti bomo pri nabiranju zajeli in jo posledično s sajenjem sadik, vzgojenih iz tega semena, ponovno vnesli v gozd.

Metode razvrščanja posameznikov na podlagi Bayesove verjetnosti in filogenetska drevesa so pravilno določili izvor referenčnih vzorcev, medtem ko je bila resolucija analize glavnih komponent manjša. Vse metode, uporabljene za identifikacijo domnevnega izvora vzorcev semena, so nedvoumno pokazale, da vzorec TURs ni bil nabran v sestoji TUR; ta partija semena lahko izvira izven območja Slovenije, lahko gre za neko neznano doslej še neanalizirano populacijo bukve, ki je genetsko izrazito različna od tistih doslej analiziranih, ali pa gre celo za seme, nabrano iz različnih parkovnih dreves. Za vzorca POKs in GORp z vsemi metodami ugotovljamo, da prihajata iz istega sestoja. Za skupni izvor vzorcev GORp in GORs ni konsenza, medtem ko odstopanje rezultatov analize pri metodi UPGMA za vzorca BLE in BLEs lahko razložimo z majhno velikostjo vzorca BLE, v katerem so bili prisotni tudi ničelni aleli v zmerno velikem deležu, kar bi lahko vplivalo na rezultate analize.

Za partiji GRM z oznakama TURs in POKs je bila izdaja glavnega spričevala zavrnjena z odločbo. Velika genetska pestrost znotraj populacij in majhna variabilnost med populacijami otežujejo identifikacijo domnevnega izvora GRM. Po drugi strani pa so številni postopki manipulacije GRM izziv vodenja evidenc. Znani so tudi primeri namerno napačno označenega izvora GRM (Finkeldey in sod. 2010). Molekularne metode,

ki omogočajo identifikacijo oziroma potrditev navedenega izvora GRM lahko izboljšajo kontrolo izvora in kakovosti GRM in pripomorejo k odpornejšemu gozdu v prihodnosti. Gozdarski inštitut Slovenije ima znanje, opremo in mandat za opravljanje takih testov, ki so se v predstavljenem primeru izkazali kot potrebni in preprečili vnos neprimerne GRM v slovenske gozdove.

5 SUMMARY

Quality and origin of forest reproductive material (FRM) define the possible genetic diversity, structure, survival and development of seedlings and resilience of the future forest to stress and disturbances. Molecular methods can provide information about the origin (provenance) and genetic quality of FRM. They can be employed to assess whether seeds originate from the stand specified by the seed collector or the nursery. In accordance with the Act on Forest Reproductive Material (2002) and its subordinate regulations, Slovenian Forestry Institute (SFI) stores samples from each tree, from which seed has been collected as a reference for verification of the origin of FRM. In this study, provenance and genetic diversity of FRM collected from four beech (*Fagus sylvatica* L.) seed stands in 2016 were analysed due to the suspicion of (intentional) mislabelling of the origin of the FRM. Assessment of the number of parent trees from which the seeds were collected was also performed. Tests were based on the analysis of highly variable nuclear microsatellites that are routinely used in the Laboratory for forest genetics at the SFI.

From a technical perspective, the selected microsatellite markers proved to be suitable for identification of individual trees, assessment of genetic diversity and verification of seed provenance. The latter was done by comparison with reference samples stored in the Slovenian Forest Gene Bank.

Our results revealed that many of the seeds collected from the ground did not belong to only one seed tree. Such condition is expected when seeds are collected from the ground. After removing genotypes inconsistent with the same seed tree, it was often impossible to reconstruct

the seed tree genotype due to a too low sample number. Consequently, we were unable to infer the number of seed trees from which the seeds had been collected. Jones et al. (2010) recommend that a minimum of 8-10 seeds must be analysed for successful parent genotype inference. Based on our findings, we need to analyse at least 12 seeds per a putative seed tree to assure successful inference of the seed tree genotype.

As expected, genetic diversity of smaller samples – seeds collected from fewer seed trees – was lower compared to samples of larger size; the association was moderate and statistically significant. In practice this means that the more trees we collect seeds from, the larger portion of the stand's genetic diversity is going to be captured and consequently reintroduced into the forest through seedlings cultivated from the collected seeds.

Clustering based on Bayesian probability and phylogenetic inference methods both correctly determined the origin of reference samples, while principal components analysis (PCA) suffered from a lower resolution. All methods used for verifying FRM provenance in this study unambiguously showed that seed sample TURs did not originate from the declared stand TUR and was possibly from an unknown beech provenance very different to the ones already analysed across the Slovenian territory, or that it did not originate from Slovenia at all, or that it originated from beech varieties found in any easily accessible park. All methods confirmed that seed samples POKs and GORp originate from the same stand. No consensus was reached on the common origin of samples GORs and GORp. UPGMA method did not provide support for matching seed sample BLEs to reference tree samples from the stand BLE. This discrepancy can be explained by the small sample size of the BLE which, combined with a moderately high frequency of the detected null alleles, could have affected the results of the UPGMA analysis.

For the FRM units, associated with samples TURs and POKs, issuing of a master certificate was declined with a decree.

High intrapopulation genetic diversity and low interpopulation genetic diversity make determination of putative provenance of beech FRM

in Slovenia difficult. Also numerous handling procedures for FRM make keeping registries a challenge. Cases of deliberate sample mislabelling have also been reported (Finkeldey et al. 2010). Molecular methods are a potent tool for identification or verification of the declared origin of FRM and can be used to directly improve control over the origin and quality of FRM and consequently contribute to healthier and more resilient forests in the future. The Slovenian Forestry Institute has the know-how, equipment and mandate to perform such testing, which, in the presented case, has proven its worth and prevented the introduction of unsuitable FRM into Slovenian forests.

6 ZAHVALA

6 ACKNOWLEDGEMENT

Delo je bilo financirano v okviru javne gozdarske službe, naloge 3, ki jo financira MKGP, ciljnih raziskovalnih projektov V4-1438 in V4-1616, ki jih financirajo MKGP in ARRS, ter programske skupine P4-0107. Del analiziranih vzorcev izhaja iz molekularne baze GSO, ki jo financira javna gozdarska služba. Za pomoč v laboratoriju in na terenu se zahvaljujemo Barbari Štupar in Meliti Hrenko.

7 VIRI

7 REFERENCES

- Bajc M., Kraigher H. 2016. SOP FIGE DNA EXTR LIO PLANT: Ekstrakcija DNA iz liofiliziranih rastlinskih tkiv, standardni operacijski postopek, verzija 1.1. Gozdarski inštitut Slovenije, Ljubljana, april 2016 (neobjavljeno).
- Bajc M., Kraigher H. 2016. SOP FIGE LIO-PLANT: Liofilizacija rastlinskega materiala, standardni operacijski postopek, verzija 1.1. Gozdarski inštitut Slovenije, Ljubljana, april 2016 (neobjavljeno).
- Bajc M., Kraigher H. 2016. SOP FIGE PCR: Standardni protokoli pomnoževanja s PCR, standardni operacijski postopek, verzija 1.2. Gozdarski inštitut Slovenije, Ljubljana, maj 2016 (neobjavljeno).
- Bajc M., Kraigher H. 2016. SOP FIGE FA: Fragmentna analiza, standardni operacijski postopek, verzija 1.0. Gozdarski inštitut Slovenije, Ljubljana, maj 2016 (neobjavljeno).
- Broadhurst L., Boshier D. 2014. Seed provenance for restoration and management: conserving evolutionary potential and utility. V: Genetic considerations in

- ecosystem restoration using native tree species. Bozzano M, Jalonen R, Thomas E, Boshier D, Gallo L, Cavers S, Bordacs S, Smith P, Loo J. (ur.). Rim, FAO: str. 27–37.
- Earl D., von Holdt B. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genet Resour*, 4: 359–361. doi: 10.1007/s12686-011-9548-7.
- Eurlings M. C. M., van Beek H. H., Gravendeel B. 2010. Polymorphic microsatellites for forensic identification of agarwood (*Aquilaria crassna*). *Forensic Science International* 197, 1-3: 30–34. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.12.017>.
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611–2620. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x.
- Fady B., Aravanopoulos F. A., Alizoti P., Mátyás C., von Wühlisch G., Westergren M., Belletti P., Cvjetkovic B., Ducci F., Huber G., Kelleher C. T., Khaldi A., Kharrat M. B. D., Kraigher H., Kramer K., Mühlethaler U., Peric S., Perry A., Rousi M., Sbay H., Stojnic S., Tijardovic M., Tsvetkov I., Verela M. C., Vendramin G. G., Zlatanov T. 2016. Evolution-based approach needed for the conservation and silviculture of peripheral forest tree populations. *Forest Ecology and Management*, 375: 66–75. doi: 10.1016/j.foreco.2016.05.015.
- Falush D., Stephens M., Pritchard J. K., 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164: 156–1587.
- Finkelday R., Leinemann L., Gailing O. 2010. Molecular genetic tools to infer the origin of forest plants and wood. *Appl Microbiol Biotechnol*, 85: 1251–1258. doi: 10.1007/s00253-009-2328-6.
- Frankham R., Ballou J. D., Briscoe D. A. 2002 *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press, Cambridge: 644 str.
- Gugger P. F., Fitz-Gibbon S., Pellegrini M., Sork V. L. 2016. Species-wide patterns of DNA methylation variation in *Quercus lobata* and their association with climate gradients. *Molecular Ecology*, 25: 1665–1680.
- Hardy O. J., Vekemans X. 2002. Spagedi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology*, 2: 618–620.
- Hubisz M. J., Falush D., Stephens M., Pritchard J. K. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, 9: 1322–1332. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x.
- Jan C., Fumagalli L. 2016. Polymorphic DNA microsatellite markers for forensic individual identification and parentage analyses of seven threatened species of parrots (family Psittacidae). *PeerJ*, doi: 10.7717/peerj.2416.
- Jones A. G., Small C. M., Paczolt K. A., Ratterman N. L. 2010. A practical guide to methods of parentage analysis. *Molecular Ecology Resources*, 10: 6–30. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02778.x.
- Jump A. S., Marchant R., Penuelas J. 2009. Environmental change and the option value of genetic diversity. *Trends Plant Sci*, 14, 1: 51–58. doi:10.1016/j.tplants.2008.10.002.
- Konnert M., Behm A. 2006. Proof of identity reproductive material based on reference samples. *Mitt. Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft*, 221: 61–71.
- Konnert M., Fady B., Gömöry D., A'Hara S., Wolter F., Ducci F., Koskela J., Bozzano M., Maaten T., Kowalczyk J. 2015. European Forest Genetic Resources Programme (EUFORGEN): Use and Transfer of Forest Reproductive Material in Europe in the Context of Climate Change. *Biodiversity International*, Rome, Italy, 77 str.
- Konnert M., Hosius B. 2010. Contribution of forest genetics for a sustainable forest management. *Forstarchiv*, 5, 4: 170–174.
- Kopelman N. M., Mayzel J., Jakobsson M., Rosenberg N. A., Mayrose I. 2015. »CLUMPAK: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K«. *Molecular Ecology Resources*, 15, 5: 1179–1191, doi: 10.1111/1755-0998.12387.
- Koskela J., Buck A., Teissier du Cros E. 2007. Climate change and forest genetic diversity: Implications for sustainable forest management in Europe. *Biodiversity International*, Rome, Italy: 111 str.
- Latzel V., Allan E., Bortolini Silveira A., Colot V., Fischer M., Bossdorf O. 2013. Epigenetic diversity increases the productivity and stability of plant populations. *Nature Communications*, 4: 2875. doi: 10.1038/ncomms3875.
- Lefevre S., Wagner S., Petit R. J., De Lafontaine G. 2012. Multiplexed microsatellite markers for genetic studies of beech. *Molecular Ecology Resources*, 12, 484–491. doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.03094.x.
- Lexer C., Heinze B., Steinkellner H., Kampfer S., Ziegenhagen B., Glössl J. 1999. Microsatellite analysis of maternal half-sib families of *Quercus robur*, pedunculate oak: detection of seed contaminations and inference of the seed parents from the offspring. *Theoretical and applied Genetics*, 99: 185–191.
- Miller S. M., Harper C. K., Bloomer P., Hofmeyr J.,

- Funston P. J. 2014. Evaluation of microsatellite markers for populations studies and forensic identification of African lions (*Panthera leo*). *Journal of Heredity*, 105, 6: 762-72. doi: 10.1093/jhered/esu054.
- Peakall R., Smouse P. 2012. GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*, 28: 2537-2539. doi: 10.1093/bioinformatics/bts460
- Potter K. M., Jetton R. M., Bower A., Jacobs D. F., Man G., Hipkins V. D., Westwood M. 2017. Banking on the future: progress, challenges and opportunities for the genetic conservation of forest trees. *New Forests*, doi 10.1007/s11056-017-9582-8.
- Pravilnik o spremembah in dopolnitvah Pravilnika o potrdilih in glavnih spričevalih za gozdni reprodukcijski material. 2012. Ur. l. RS št. 55/12.
- Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155: 945-959.
- R Development Core Team, 2016. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Dunaj, Avstrija.
- Rousset F. 2008. genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8: 103-106. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x.
- Skroppa T., Tollefsrud M. M., Sperisen C., Johnsen O. 2009. Rapid change in adaptive performance from one generation to the next in *Picea abies* - Central European trees in a Nordic environment. *Tree Genetics & Genomes*, 6, 1: 93-99.
- Takezaki N., Nei M., Tamura K. 2010. POPTREE2: Software for constructing population trees from allele frequency data and computing other population statistics with Windows-interface. *Molecular Biology and Evolution*, 27: 747-752.
- Westergren M., Jarni K., Brus R., Kraigher H. 2012. Implications for the use of forest reproductive material of Common ash (*Fraxinus excelsior* L.) in Slovenia based on the analysis of nuclear microsatellites. *Šumarski List*, 136, 5/6: 263-271. <http://hrcak.srce.hr/84711>.
- Zakon o gozdnem reprodukcijskem materialu. 2002, 2004, 2011. Ur. l. RS št. 58/02, 85/02, 45/04, 77/11.