

# METODIKA OVĚŘOVÁNÍ DEKLAROVANÉHO PŮVODU KLONŮ V SEMENNÝCH SADECH NA PRINCIPU ANALÝZ DNA

LESNICKÝ PRŮVODCE



Bc. Ing. et Ing. PETR NOVOTNÝ, Ph.D.  
Ing. Bc. JAROSLAV DOSTÁL



11/2018

# **Metodika ověřování deklarovaného původu klonů v semenných sádkách na principu analýz DNA**

**Certifikovaná metodika**

**Bc. Ing. et Ing. Petr Novotný, Ph.D.  
Ing. Bc. Jaroslav Dostál**

Strnady 2018

## **Lesnický průvodce 11/2018**

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

Strnady 136, 252 02 Jíloviště

[www.vulhm.cz](http://www.vulhm.cz)

Publikace vydané v řadě Lesnický průvodce jsou dostupné v elektronické verzi na:

[http://www.vulhm.cz/lesnicky\\_pruvodce](http://www.vulhm.cz/lesnicky_pruvodce)

**Vedoucí redaktor:** Ing. Jan Řezáč; e-mail: [rezac@vulhm.cz](mailto:rezac@vulhm.cz)

**Výkonná redaktorka:** Miroslava Valentová; e-mail: [valentova@vulhmop.cz](mailto:valentova@vulhmop.cz)

**Grafická úprava a zlom:** Klára Šimerová; e-mail: [simerova@vulhm.cz](mailto:simerova@vulhm.cz)

ISBN 978-80-7417-157-4

ISSN 0862-7657

# **METHODOLOGY FOR VERIFICATION OF DECLARED ORIGIN OF CLONES OF FOREST TREE SPECIES IN SEED ORCHARDS BY USING MOLECULAR-GENETIC ANALYZES**

## *Abstract*

Seed orchards, where clone and ramet composition do not respond to registered documentation cannot be accepted as a source of qualified reproductive material. Until recently, it was not possible to verify precisely whether ramets in the appropriate design orchard positions exactly correspond to their declared origin (ortet). The presented methodology based on the principles of DNA analyzes (nSSR) includes the verification approach of the seed establishment in two variants: 1) in previously established seed orchards it is the verification of clone homogeneity, i.e. conformity of the DNA markers in ramets, which they should belong to the same clone according to the seed orchard design, 2) in newly established seed orchards for which reference samples from original ortets are available the verification is based on the detection of the clone identity, or the identity of ramets and their original ortet, respectively. The first part of the methodology shows the legislative framework of the seed orchards certification process in the Czech Republic. The second main part then describes the step by step algorithm related to testing (selection of clones and ramets, decision formulations). Corrective provisions are formulated depending on the degree of misconducts based on the results of molecular-genetic analyzes. To facilitate the practical use of the proposed testing procedure, an Excel 2013 application has also been created to allow random clones and ramets selection for testing, which is available for free on the internet.

**Key words:** seed orchard; clone mixture; forest trees; molecular analyzes; DNA; nSSR; control of origin; clone identity; verifying

**Recenzenti:** Ing. Miloš Pařízek, ÚHÚL Brandýs nad Labem, pobočka Hradec Králové

RNDr. Slavomír Rakouský, CSc., odborný konzultant, České Budějovice

*Foto na obálce:*

Semenný sad modřínu opadavého na lokalitě Bílovice nad Svitavou (V. Buriánek, březen 2013)

*Adresa autorů:*

Bc. Ing. et Ing. Petr Novotný, Ph.D.

Ing. Bc. Jaroslav Dostál

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

Strnady 136

156 00 Praha 5 – Zbraslav

e-mail: [pnovotny@vulhm.cz](mailto:pnovotny@vulhm.cz)

[dostal@vulhm.cz](mailto:dostal@vulhm.cz)

# Obsah:

<b>1 ÚVOD A CÍL METODIKY</b> .....	<b>7</b>
<b>2 VLASTNÍ POPIS METODIKY</b> .....	<b>10</b>
2.1 Charakteristika semenných sadů v ČR .....	10
2.2 Legislativní rámec uznávání semenných sadů .....	13
2.3 Současný proces uznávání semenného sadu za zdroj kvalifikovaného reprodukčního materiálu .....	14
2.4 Princip využití molekulárně-genetických analýz při kontrole klonální identity v semenných sadech .....	15
2.5 Postup porovnání skutečného stavu vysazených jedinců s registrovanou dokumentací semenného sadu pomocí analýz DNA .....	18
2.5.1 Odběr referenčních vzorků .....	19
2.5.2 Postup provedení testu (genetického screeningu) vybraného sadu .....	21
2.5.3 Testovací varianta A: Semenné sady, u kterých nejsou k dispozici referenční vzorky odebrané z ortetů, ze kterých byly založeny .....	21
2.5.4 Testovací varianta B: Semenné sady, u kterých jsou k dispozici referenční vzorky ortetů/ mateřských rodičů rodin, ze kterých byly založeny .....	23
2.5.5 Algoritmus výběru ortetů/mateřských rodičů rodin a konkrétních ramet/generativních potomků .....	24
2.5.6 Formulace rozhodnutí v závislosti na výsledcích analýz DNA .....	27
<b>3 SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ</b> .....	<b>28</b>
<b>4 POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY</b> .....	<b>29</b>
<b>5 EKONOMICKÉ ASPEKTY</b> .....	<b>30</b>
<b>6 DEDIKACE</b> .....	<b>32</b>

<b>7 LITERATURA</b> .....	<b>33</b>
7.1 Seznam použité související literatury .....	33
7.2 Seznam publikací, které předcházely metodice .....	36
<b>SUMMARY</b> .....	<b>38</b>

# 1 ÚVOD A CÍL METODIKY

Zakládání a využívání semenných sadů je důležitým nástrojem šlechtění lesních dřevin, ale i opatřením na zachování a reprodukci určité části jejich genofondu. Semenné sady mají význam především pro zvyšování produkce a kvality obnovovacích či nově zakládaných lesních porostů, ale u hospodářsky méně ceněných druhů se mohou podílet i na zvyšování genetické diverzity výsadeb. U vzácných a ohrožených dřevin mohou semenné sady kromě svého hlavního poslání plnit paralelně i funkci klonových archivů (např. JELÍNKOVÁ, ZATLOUKAL 2001; ZATLOUKAL et al. 2001), které slouží nejen pro potřeby lesníků, ale nacházejí využití i v rámci aktivit rezortu ochrany přírody a krajiny.

Semenné sady představují v praxi objekty, jejichž zakládání, údržba a využívání jsou spojeny s vysokými finančními náklady, ale i s náročnými požadavky na plánování a organizaci činností, které většinou vyžadují vzájemnou spolupráci různých subjektů. Proto je třeba věnovat velkou pozornost výběru zdrojových stromů (ortetů<sup>1</sup>, resp. v případě tzv. jádrových semenných sadů rodičů rodin<sup>2</sup>), administrativním úkonům a venkovním pracím spojeným se zakládáním semenných sadů. Pro hladký průběh pozdějšího uznávacího řízení a zajištění řádného naplnění očekávaných funkcí semenného sadu je rovněž mimořádně důležitá volba pracovníků, kteří budou zajišťovat výběr ortetů/rodičů rodin, sběr rouků, uchovávání a přepravu rostlinného materiálu, evidenci v průběhu celého procesu, návrh schématu rozmístění klonů<sup>3</sup> a ramet<sup>4</sup> (tj. návrh designu semenného sadu), výsadbu roubovanců a navazující údržbu.

Semenný sad, při jehož zakládání došlo k výrazným pochybením, byť i neúmyslným, nemůže být osobou pověřenou Ministerstvem zemědělství ČR na základě zákona č. 149/2003 Sb., ve znění pozdějších předpisů, uznán jako zdroj kvalifikovaného reprodukčního materiálu. Předchozí vynaložené pracovní kapacity a finanční prostředky se tak nepromítnou v zamýšlený plánovaný záměr, neboť osivo ze semenného sadu, který nebyl uznán, nelze v podmínkách EU uvádět do oběhu ani použít pro umělou obnovu lesa a zalesňování.

Zdroje chyb, které mohou být odhaleny při kontrole (vzájemná neshoda výsledků genetických analýz klonů/ramet s údaji o jejich deklarovaném původu v dokumen-

---

<sup>1</sup> Ortet = jedinec (strom) určený k odběru částí rostlin pro účely jeho reprodukce vegetativním způsobem.

<sup>2</sup> Rodič rodiny = strom určený k produkci potomstva kontrolovaným nebo volným opylováním určeného jednoho samičího rodiče pylem jednoho samčího rodiče nebo pylem více určených nebo neurčených samčích rodičů, pro generativní způsob reprodukce.

<sup>3</sup> Klon = skupina vegetativně namnožených potomků (ramet) získaná z jediného výchozího jedince (ortetu).

<sup>4</sup> Rameta = příslušník klonu s vlastní podzemní i nadzemní částí a schopností samostatné existence.



taci sadu, resp. schématu výsadby) mohou být různé. K omylu může teoreticky dojít již při odběru roubů (odběr z jiného stromu), dále záměnou či pomícháním roubů z různých ortetů, záměnou roubovanců při školkování, vyzvedávání, zakládání sadu, vylepšování, dále přerůstáním podnože rouby, ale i při evidenci (zhotovování, popisování a umísťování evidenčních štítků, přepisování údajů do PC ap.).

Evidence v průběhu všech kroků předcházejících uznávacímu řízení semenného sadu proto vyžaduje pracovníky s vysokou mírou zodpovědnosti a pečlivosti, kteří zároveň dozírají i na ostatní osoby, které se celého procesu účastní. Správný výběr těchto klíčových pracovníků je pro zamezení chyb, a tím dosažení budoucího bezproblémového úředního uznání semenného sadu, zcela zásadní.

Donedávna nebylo možné exaktním způsobem zkontrolovat, zda jedinci (ramety jednotlivých klonů) rostoucí na příslušných pozicích evidovaných ve schématu výsadby semenného sadu (plánku) skutečně odpovídají deklarovanému původu (ortetu nebo rodiči rodiny). Rozvoj molekulárně-genetických analytických metod v posledních desetiletích však dává státní správě do rukou nástroj, který je využitelný při zjišťování nesouladů mezi skutečností a údaji uváděnými v žádosti o uznání zdroje kvalifikovaného reprodukčního materiálu.

V souvislosti s potenciálním uplatněním kontrolních mechanismů využívajících výsledky analýz DNA je třeba zmínit i „*Národní program ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin na období 2019–2027*“ (dále jen Národní program), k jehož vyhlášení je MZe ČR zmocněno zákonem č. 149/2003 Sb., ve znění pozdějších předpisů. Cílem Národního programu je podporovat zodpovědné vlastníky genetických zdrojů lesních dřevin kompenzací jejich vyšších nákladů, ze kterých má prospěch celá společnost. Dřeviny, jejichž reprodukční materiál lze uvádět do oběhu pouze jako identifikovaný, selektovaný, kvalifikovaný nebo testovaný a dřeviny, které mohou být předmětem zařazení do Národního programu, jsou taxativně uvedeny ve vyhlášce č. 393/2013 Sb. V případě nově zakládaných semenných sadů se předpokládá, že u dřevin, pro něž jsou v ČR k dispozici ověřené genové markery s vysokou rozlišovací schopností na úrovni jedinců využitelné při ověřování klonální identity, bude pro uznání semenného sadu možno vyžadovat ověření deklarovaného původu reprodukčního materiálu prostřednictvím namátkového testu (genetického screeningu) vybraných klonů/ramet pomocí analýz DNA.

Cílem metodiky je poskytnout pověřené osobě, kterou je Ústav pro hospodářskou úpravu lesů Brandýs nad Labem (ÚHÚL), za účelem uznávání zdrojů kvalifikovaného reprodukčního materiálu ve smyslu § 15 odst. 2 a § 30 odst. 2 písm. l) zákona č. 149/2003 Sb., ve znění pozdějších předpisů, jednoduše aplikovatelný postup umožňující ověřit genetickou shodu biologických vzorků odebraných z ramet vybraných klonů rostoucích v registrovaných semenných sadech s údaji o původu,

deklarovanými v průvodní dokumentaci sadů, která je uložena u pověřené osoby, a to u dříve zakládaných sadů s využitím klonální homogenity (genetické identity ramet v rámci klonu) a u nově zakládaných sadů s využitím genetické identity ramet příslušného klonu a archivovaných referenčních vzorků jejich ortetů, které jsou uchovávány na pracovišti určené osoby, kterou je Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., ve Strnadlech (VÚLHM).

## 2 VLASTNÍ POPIS METODIKY

### 2.1 Charakteristika semenných sadů v ČR

Dlouhé intervaly mezi semennými roky u některých lesních dřevin, doprovázené někdy i méně optimálními podmínkami pro tvorbu šištic či květů, jsou spolu s obtížností sběru propagulí<sup>5</sup> z kvalitních vysokých stromů a administrativní náročností (každý oddíl reprodukčního materiálu je nutné evidovat samostatně podle uznávaných jednotek, přičemž oddíly kvalifikovaného reprodukčního materiálu se neslučují) v provozních podmínkách obecnými příčinami omezeného využívání reprodukčního materiálu z nejhodnotnějších genetických zdrojů k obnově lesa. Snahou o řešení tohoto problému je zakládání a využívání semenných sadů, jejichž účelem je produkovat v dostatečném množství kvalitní osivo pro potřeby obnovy porostů v jednotlivých přírodních lesních oblastech (ZAVADIL 1982; KAŇÁK et al. 2008).

První semenné sady v Československu byly zakládány v 50. letech minulého století. S novými poznatky a vývojem legislativy se požadavky na jejich zakládání v čase měnily, takže některé z dříve založených objektů v současnosti nesplňují legislativní podmínky kladené na zdroje kvalifikovaného reprodukčního materiálu využitelného k obnově lesa.

V roce 1966 vydalo Ministerstvo zemědělství a lesního hospodářství *Směrnice pro uznávání lesních porostů a výběrových stromů pro sběr osiva*, jejichž součástí byl i vzor uznávacího listu pro výběrové stromy (v dnešní terminologii ortety = donorové stromy roubů pro založení semenného sadu). VÚLHM později v edici Lesnický průvodce vydal *Metodiku zakládání semenných plantáží*<sup>6</sup> (ZAVADIL 1969). V roce 1971 pak vstoupily v platnost *Směrnice pro zakládání semenných porostů a semenných plantáží*, které mj. zahrnovaly i *Metodické pokyny pro zakládání semenných plantáží*. Obsah uvedených směrnic byl později podrobněji rozveden v monografii věnované zakládání semenných sadů (ZAVADIL 1982). Novější příručky zabývající se danou problematikou byly v případě potřeby publikovány i v dalších obdobích (např. IVANEK, PROCHÁZKOVÁ 2008; KAŇÁK et al. 2008; IVANEK et al. 2010). I tyto publikace jsou však dnes již zastaralé, zejména z pohledu legislativy.

K 31. 12. 2017 bylo v rejstříku uznaných zdrojů (ÚHÚL 2018) evidováno 106 uznávaných semenných sadů o celkové ploše 265,91 ha (obr. 1, tab. 1). Jde o 70 semenných

---

<sup>5</sup> Propagule = část organismu sloužící k šíření a reprodukci.

<sup>6</sup> Semenná plantáž = starší synonymum pro semenný sad.

sadů (225,08 ha) pro 8 jehličnatých a 36 sadů (40,83 ha) pro 12 listnatých druhů dřevin. Průměrně je v ČR v jednom semenném sadu zastoupeno ca 50 klonů, minimální počet klonů je ca 30, maximální ca 70–100 (PAŘÍZEK 2018, in verb).

Za do jisté míry obdobné zdroje kvalifikovaného reprodukčního materiálu jako semenné sady lze z hlediska předmětu této metodiky považovat rovněž směsi klonů, neboť zde prezentované kontrolní principy jsou využitelné i pro objekty tohoto typu.



**Obr. 1:** Pohled na semenný sad borovice lesní CZ-3-3-BO-100-30-2-B (2,58 ha, 350 m n. m., původně vysazeno 674 ramet 72 klonů) založený v roce 1989 na lokalitě ŠLP Křtiny, Bílovice nad Svitavou (Zdroj: mapy.cz)

**Tab. 1:** Počet a plocha semenných sadů k 31. 12. 2017 dle dřevin (ÚHÚL 2018)

<b>Druh dřeviny</b>	<b>Počet</b>	<b>Plocha [ha]</b>
smrk ztepilý	19	54,36
borovice lesní	26	88,93
borovice blatka	2	1,32
borovice limba	1	4,65
jedle bělokorá	1	1,60
jedle obrovská	1	2,34
modřín opadavý	19	70,88
douglaska tisolistá	1	1,00
buk lesní	3	3,56
jilm habrolistý	3	3,65
jilm drsný	3	5,09
jilm vaz	3	2,89
lípa srdčitá	4	5,35
lípa velkolistá	1	1,35
javor klen	5	6,14
třešeň ptačí	8	8,10
jeřáb břek	3	2,17
jeřáb oskeruše	1	0,87
olše lepkavá	1	1,40
topol osika	1	0,26
<b>Celkem</b>	<b>106</b>	<b>265,91</b>

K 31. 12. 2017 bylo v ČR evidováno 23 uznaných zdrojů kvalifikovaného reprodukčního materiálu typu směs klonů pro 5 druhů dřevin: 1 pro topol osika (2,00 ha), 14 pro smrk ztepilý (11,56 ha), 4 pro topol černý (0,36 ha), 2 pro šlechtěné topoly (0,50 ha) a 2 pro vrbu bílou (3,05 ha). Celková plocha těchto objektů činila 17,47 ha. V roce 2017 byly v registrovaném stavu vedeny další 2 směsi klonů smrku ztepilého a 1 směs klonů jilmu drsného. Další 1 směs klonů šlechtěných topolů (0,50 ha) byla evidována jako zdroj testovaného reprodukčního materiálu (ÚHÚL 2018).

## 2.2 Legislativní rámec uznávání semenných sadů

Semenný sad se zakládá podle dokumentace registrované a schválené pověřenou osobou. Podkladem pro zakládání, registraci dokumentace a uznávání semenných sadů za zdroje kvalifikovaného reprodukčního materiálu je zákon č. 149/2003 Sb., ve znění pozdějších předpisů (dále jen „zákon“) a prováděcí vyhláška č. 29/2004 Sb., ve znění pozdějších předpisů (dále jen „vyhláška“). Dalším dokumentem, který má vazbu na správnost původu a rozmístění ramet v semenném sadu, je Národní program.

Podle § 2 zákona se zdrojem reprodukčního materiálu **semenný sad** rozumí **účelová výsadba selektovaných klonů nebo reprodukčního materiálu získaného z rodiče rodiny**, který je izolován nebo obhospodařován tak, že sprášení pylem pocházejícím z rostlin nacházejících se mimo semenný sad je vyloučeno nebo omezeno, pro generativní způsob reprodukce.

Podle § 15 zákona lze za zdroj kvalifikovaného reprodukčního materiálu uznat pouze **semenný sad**, rodiče rodiny, ortet, klon nebo **směs klonů**, který **vyhovuje požadavkům na postup při založení zdroje a při jeho dalším udržování**, jakož i **požadavkům na jeho genetickou a morfologickou kvalitu**, polohu, rozlohu, věk, **strukturu** a zdravotní stav a který splňuje podmínky vhodnosti stanoviště. **Uznávání zdroje kvalifikovaného reprodukčního materiálu provádí pověřená osoba** na základě vlastního odborného posudku. Podrobnosti o požadavcích pro uznání zdroje za zdroj kvalifikovaného reprodukčního materiálu a o jeho označování stanoví vyhláška.

V § 10 vyhlášky je uvedeno, že semenný sad nebo směs klonů se **zakládá podle dokumentace registrované pověřenou osobou**. Za zdroj kvalifikovaného reprodukčního materiálu je možno je uznat, **pokud jejich stav je v souladu s dokumentací** a splňují požadavky uvedené v příloze č. 26 vyhlášky. **Semenný sad je možno uznat jako zdroj kvalifikovaného reprodukčního materiálu teprve tehdy, když v sadu v souladu s dokumentací pro založení zůstal zachován potřebný počet a skladba klonů** s dobrým zdravotním stavem a semenný sad je ve věku, kdy nastoupila plodnost, na které se podílí nadpoloviční většina zastoupených klonů. **Směs klonů** je možno uznat tehdy, když je **schopna poskytovat reprodukční materiál ve skladbě**, množství a kvalitě, **podle dokumentace** pro založení uznaného zdroje registrované pověřenou osobou.

V § 11 zákona je dále uvedeno, že **pokud pověřená osoba zjistí, že uznaný zdroj nesplňuje požadavky** stanovené tímto zákonem a jeho prováděcími právními předpisy, **zruší uznání** zdroje reprodukčního materiálu<sup>7</sup>.

---

<sup>7</sup> Dokud nebude stav uznaného zdroje opět uveden do souladu s legislativou, nelze na produkovaný reprodukční materiál vystavovat potvrzení o původu.

## 2.3 Současný proces uznávání semenného sadu za zdroj kvalifikovaného reprodukčního materiálu

Uznávání zdrojů reprodukčního materiálu a koordinaci Národního programu provádí Ministerstvem zemědělství pověřená osoba (ÚHÚL).

1. Vlastník vytvoří **dokumentaci semenného sadu** v souladu s přílohou č. 26 vyhlášky (lokalizace sadu, druh dřeviny, kvalita výchozích jedinců – ortetů<sup>8</sup>, cíl, plán křížení a **polohové schéma**, komponenty a **údaje o jejich provenienci**, izolace, stanovištní podmínky). **Jakékoliv změny** těchto parametrů **musí být schváleny a registrovány pověřenou osobou**.
2. Vlastník pošle **žádost o registraci dokumentace**.
3. ÚHÚL vydá doklad **o registraci dokumentace semenného sadu** ke konkrétnímu datu. Přidělí prozatímní evidenční číslo uznané jednotky a stanoví návrh použití (povoleného přenosu) reprodukčního materiálu původem ze sadu, který je po uznání nutno dodržovat. Výjimky jsou možné pouze jako reakce na nahlášené a schválené změny v registrované dokumentaci sadu, zejména ve složení původu rodičovských jedinců. Ve zvláštních případech lze registraci dokumentace zrušit (např. při hromadném odumření roubovanců v důsledku biotických či abiotických vlivů).
4. V návaznosti na registraci dokumentace může vlastník začít činit kroky vedoucí k **založení semenného sadu**. Původ klonů dokládá potvrzením o původu (PoP) na části rostlin (v databázi ERMA 2 spravované ÚHÚL Brandýs nad Labem pro link na PoP). **Pokud** se vlastník domnívá, že **stav semenného sadu je v souladu s podmínkami** vyhlášky, jejichž splnění je vyžadováno **pro jeho uznání** (plodí nadpoloviční většina roubovanců), zahájí podáním příslušné žádosti **uznávací proces**. Vzhledem k dlouhé době, která uplyne od založení semenného sadu do okamžiku jeho uznání, jsou v ERMA 2 (<http://eagri.cz/public/app/uhul/ERMA2>) evidovány i registrované semenné sady se schválenou dokumentací, které na uznávací řízení teprve čekají (ÚHÚL 2018).
5. ÚHÚL **vystaví doklad o uznání zdroje** s platností nejvýše na 10 let (s možností výjimečného prodloužení na základě § 11 zákona). Semenné sady nemusí zahrnovat reprodukční materiál pouze z jedné přírodní lesní oblasti, ale složení původu rodičovských jedinců musí souhlasit s pravidly přenosu reprodukčního materiálu použitého pro umělou obnovu lesa a zalesňování (zákon č. 289/1995 Sb., vyhláška č. 139/2004 Sb.).

---

<sup>8</sup> Žadatel musí počítat s nutností udělení souhlasu vlastníků ortetů k odběru roubov.

6. Všechny **změny u registrovaných i uznaných semenných sadů** (např. plánovaná dosadba jiného klonu) je **nutno oznámit<sup>9</sup> a nechat schválit ÚHÚL**. Po uplynutí 10 let musí vlastník znovu požádat o uznání zdroje kvalifikovaného reprodukčního materiálu (připojí aktualizované schéma výsadby, seznam klonů aj.), jinak objekt v evidenci automaticky přejde do stavu „archivní“. Vyvolá-li však vlastník žádost opět uznávací proces, může být takto evidovaný semenný sad znovu uznán.
7. Případné **zrušení uznání semenného sadu** provádí pověřená osoba na základě žádosti vlastníka zdroje, nebo z vlastního podnětu, např. z důvodu aktuálního stavu objektu, který již neodpovídá požadavkům legislativy, úmyslu založit nový sad, příp. úmyslu běžné obnovy lesa.
8. Pokud jde o **směsi klonů**, je legislativní princip obdobný. Pokud je však zdroj uznán jako směs klonů, **musí být** podle přílohy č. 26 vyhlášky **identita, počet a podíly klonů** obsažených ve směsi, **výběrová metoda a výchozí klony** schváleny a **registrovány pověřenou osobou** a každá směs klonů **musí vykazovat dostatečnou genetickou různorodost**. Podle § 10 vyhlášky je potom **směs klonů možno uznat** tehdy, **když** je schopna poskytovat **reprodukční materiál ve skladbě, množství a kvalitě, podle dokumentace** pro založení uznaného zdroje registrované pověřenou osobou. Jinými slovy musí být u produkovaného reprodukčního materiálu ze směsi klonů **dodržován stále stejný poměr klonů**.

## 2.4 Princip využití molekulárně-genetických analýz při kontrole klonální identity v semenných sadech

Historicky prvním typem molekulárních markerů využívaným v českém lesnictví byly monoterpeny (např. KAŇÁK 1999, 2001). Později byly nahrazeny analýzami isoenzymů, které sloužily např. jako prostředek pro odhalování případných chyb v rozmístění ramet a homogenity klonů (IVANEK, MARTINCOVÁ 2005, 2008; IVANEK 2006; IVANEK, PROCHÁZKOVÁ 2006, 2008; IVANEK et al. 2010, 2013a, 2013b; FRÝDL et al. 2011). Nejnověji se pak pro dané účely začaly využívat analýzy DNA (např. MALÁ et al. 2013; NOVOTNÝ 2013, 2017, 2018; MÁCHOVÁ et al. 2014).

---

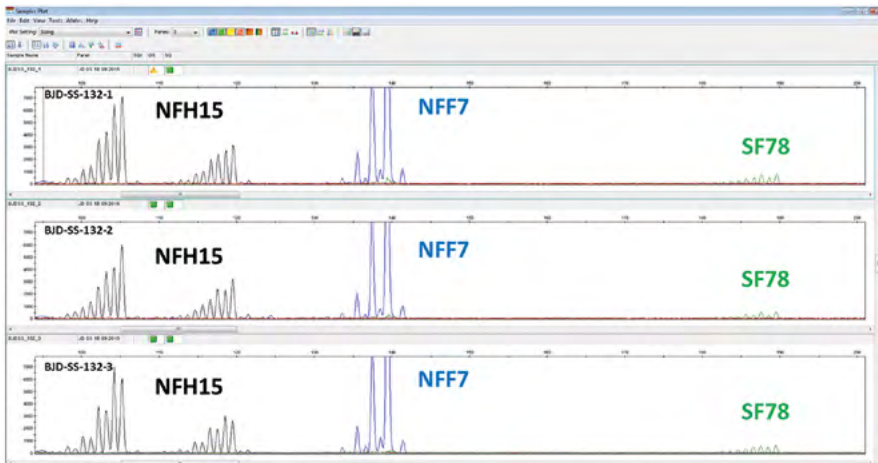
<sup>9</sup> Forma oznámení není legislativou specifikována.



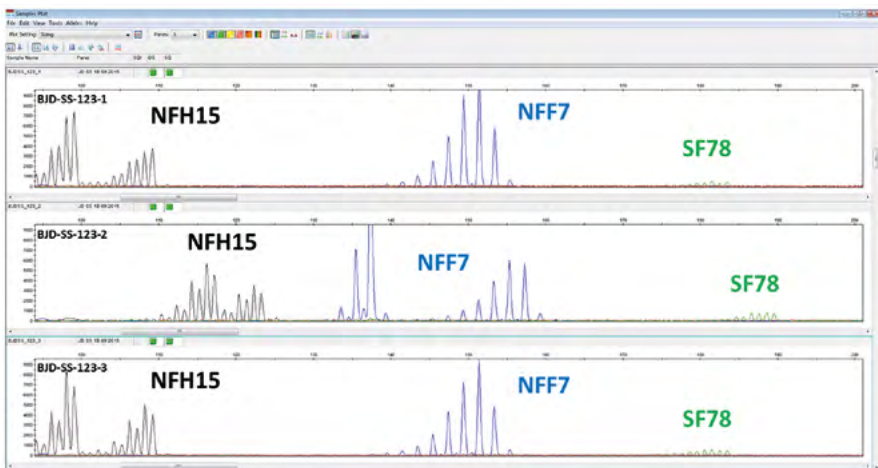
Vysoký polymorfismus jaderných mikrosatelitových markerů (nSSR) identifikovaných na řetězci DNA řady druhů dřevin mj. umožňuje genetické přiřazení částí rostlin k jedinci, z něhož byly odděleny. Tento princip našel v lesnictví využití v možnosti ověřování klonální homogenity ramet zastoupených v semenných sadech a v možnosti ověřit genetickou shodu konkrétního klonu ze semenného sadu s deklarovaným zdrojovým ortetem v lesním porostu (NOVOTNÝ 2018).

Základní postup analýz DNA (NOVOTNÝ 2013) spočívá nejprve v získání vzorku biologického materiálu (rostlinného pletiva). Z jader nebo chloroplastů buněk se poté v laboratoři pomocí sledu chemických a fyzikálních procesů získá čistá DNA. K izolované DNA se přidají fluorescenčně značené krátké úseky DNA (tzv. primery) syntetizované v komerční laboratoři podle sekvence publikované v literatuře. Tyto úseky jsou zodpovědné za označení začátku a konce části řetězce (lokusu) DNA daného druhu dřeviny s vysokou mírou polymorfismu (tj. u různých jedinců je ve zvýšené míře tato část řetězce DNA odlišná). Následuje proces amplifikace (namnožení velkého počtu kopií požadovaných lokusů DNA) polymerázovou řetězovou reakcí (PCR), aby bylo možné sledovat různé velikosti polymorfních úseků (lokusů). Předností mikrosatelitových markerů je, že mají kodominantní charakter a umožňují tak rozlišit heterozygoty a homozygoty. Ověřování klonální příslušnosti ramet v semenných sadech se konkrétně často provádí pomocí nSSR markerů (NOVOTNÝ 2017), které jsou složeny z opakujících se dvou až pětinnukleotidových motivů. Ramety různých klonů v sadu se tak mohou lišit počtem opakování (repeticí) motivů. Produkty PCR procházejí v dalším kroku fragmentační analýzou, kdy jsou na genetickém analyzátoru přesně odečítány velikosti lokusů polymorfních markerů. Výstupní datové soubory jsou dále vyhodnoceny pomocí statistických programů. Aby mohla tento postup konkrétní laboratoř aplikovat, musí celý proces nejprve optimalizovat ve svých specifických podmínkách (prostředí laboratoře, přístrojové vybavení aj.).

Výsledkem porovnání dvou ramet nebo ramety a ortetu může být buď genetická shoda ve všech analyzovaných polymorfních úsecích (lokusech) DNA odebraných vzorků (obr. 2), nebo naopak neshoda v některém či ve všech porovnávaných lokusech (obr. 3). Genetickým screeningem nelze genetickou identitu ramet v rámci jednoho klonu či genetickou identitu ramet a deklarovaného zdrojového ortetu potvrdit absolutně. S počtem použitých markerů (analyzovaných polymorfních lokusů DNA), které byly pozitivně odzkoušeny na rostlinném materiálu z území ČR, však míra pravděpodobnosti, že nebude případný odlišný genotyp odhalen, klesá. Je-li však na druhé straně zjištěn jakýkoliv rozdíl v analyzovaných lokusech ramety a lokusech jí údajně odpovídajícího klonu či ortetu, pak tato metoda jejich shodný původ vyvrací jednoznačně. Jinými slovy je metoda 100% účinná v případech, kdy jsou odhaleny chyby v deklarovaném původu vzorků, avšak při genetické shodě



**Obr. 2:** Výstup programu GeneMapper – příklad vyhodnocení velikostí alel amplifikovaných lokusů NFH15, NFF7, SF78 u 3 různých ramet klonu JD\_SS\_132 ze semenného sadu jedle bělokoré (ukázka homogenity všech 3 ramet klonu)



**Obr. 3:** Výstup programu GeneMapper – příklad vyhodnocení velikostí alel amplifikovaných lokusů NFH15, NFF7, SF78 u tří různých ramet klonu JD\_SS\_123 ze semenného sadu jedle bělokoré (prostřední ze 3 deklarovaných ramet klonu se od zbyvajících liší velikostí alel ve všech třech zkoumaných lokusech)

ve všech analyzovaných lokusech nelze zcela vyloučit potenciální rozdílný původ vzorků; s množstvím porovnávaných polymorfních lokusů však pravděpodobnost chybného závěru klesá.

Protože genetické zmapování celého semenného sadu nebývá z kapacitních a finančních důvodů v naprosté většině možné, doporučují IVANEK a PROCHÁZKOVÁ (2008) screening alespoň tří náhodně vybraných roubovanců od každého zastoupeného klonu a jejich porovnání s ortety. Pokud jde o toleranci zjištěných chyb klonální příslušnosti a rozmístění ramet v porovnání s registrovanou dokumentací semenného sadu (schématu výsadby), objevuje se v literatuře např. údaj o možnosti připustit po provedení genetického screeningu 20% nehomogenitu ramet s deklarovaným klonem (IVANEK et al. 2010). Aktuálně platná národní legislativa však žádou neshodu skutečného stavu s registrovanou dokumentací nepřipouští.

## **2.5 Postup porovnání skutečného stavu vysazených jedinců s registrovanou dokumentací semenného sadu pomocí analýz DNA**

Jedním z požadavků dotačních pravidel na podporu genetických zdrojů lesních dřevin u nově registrovaných (po 1. 1. 2015) semenných sadů a směsí klonů je odevzdat určené osobě (Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.) referenční vzorky reprodukčního materiálu, ze kterého byly či mají být semenný sad nebo směs klonů založeny, a to za účelem možnosti kontroly genetického původu jedinců. Předání vzorků určené osobě koordinuje ÚHÚL.

Vyplývá tak nutnost vytvoření standardizovaného postupu testování ramet umístěných v semenných sadech, a to jak z pohledu souladu jejich skutečného původu s deklarovaným (seznam klonů), tak z pohledu jejich rozmístění v porovnání s registrovanou dokumentací (plánek rozmístění ramet). Požadavek na testování původu klonů může vzejít jako podmínka pro uznání semenného sadu za zdroj kvalifikovaného reprodukčního materiálu zařazený do Národního programu nebo i jako standardní požadavek pro uznání ostatních semenných sadů a směsí klonů.

Pokud jde o Národní program, týká se možnost genetického ověřování pouze semenných sadů a směsí klonů původních druhů dřevin uvedených ve vyhlášce č. 393/2013 Sb., konkrétně v její příloze č. 2 „*Seznam druhů lesních dřevin, které mohou být zařazeny do Národního programu.*“ V příloze č. 1 „*Seznam druhů lesních*

*dřevin, jejichž reprodukční materiál lze uvádět do oběhu pouze jako identifikovaný, selektovaný, kvalifikovaný nebo testovaný“* téže vyhlášky jsou pak uvedeny další druhy, pro které by genetické testování semenných sadů a směsí klonů mohlo přicházet v úvahu. ÚHÚL však může teoreticky využít možnost genetického ověření souladu skutečného stavu s registrovanou dokumentací i u ostatních druhů dřevin, pro které jsou registrovány semenné sady či směsi klonů, i když nejsou ve zmíněných přílohách zařazeny.

Metodiku je technicky možné použít pouze u těch dřevin, pro které jsou k dispozici pozitivně ověřené vysoce polymorfní genové markery s rozlišovací schopností na úrovni jedinců. Na pracovišti určené osoby, kde se pro daný účel využívají jaderné mikrosatelitové (nSSR) markery, jsou postupy v současnosti optimalizovány pro smrk ztepilý, borovice lesní, jedli bělokorou, modřín opadavý, buk lesní, dub letní, dub zimní, lípu srdčitou, třešeň ptačí, javor klen a topol šedý. U dalších druhů je třeba postupy analýz DNA na základě markerů a nových informací postupně zveřejňovaných ve vědecké literatuře teprve odzkoušet a sortiment dřevin i markerů využitelných při testech identity tak průběžně rozšiřovat.

### **2.5.1 Odběr referenčních vzorků**

Jako referenční vzorky se odebírají části rostlin všech ortetů, s jejichž klony se uvažuje pro založení semenného sadu, případně u jádrových semenných sadů semenný materiál ze všech mateřských rodičů rodin, a to optimálně současně s odběrem komponent (roubů nebo semenného materiálu) pro založení sadu. Potenciálně může zakladatel sadu dodat vzorky z uznaných ortetů i dodatečně, neboť platné zásady stanovující podmínky pro poskytování dotací na ochranu a reprodukci genofondu lesních dřevin (Zásady 2018) jako jednu z podmínek poskytnutí dotace u nově registrovaných semenných sadů pouze vyžadují, aby „*byly odevzdány určené osobě (Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.) referenční vzorky reprodukčního materiálu, ze kterého byly semenný sad nebo směs klonů založeny za účelem možnosti kontroly genetického původu jedinců v semenném sadu nebo směsi klonů; předání vzorků určené osobě koordinuje ÚHÚL.*“ Jiný termín dodání vzorků je pro určenou osobu vítaný v případě, že existuje snadný a levný způsob odběru vzorků (např. výška některých větví stromů dosažitelná teleskopickými nůžkami, možnost sestřelení větví). V takovém případě je nejvhodnější doba pro odběry na jaře ve fenologické fázi rašení stromů, kdy je při izolaci v laboratoři dosahováno nejvyšší výtěžnosti kvalitní DNA.

Financování odběru vzorků a provádění testů DNA probíhá z finančních prostředků Národního programu alokovaných v rámci kapitoly „*Odběr referenčních vzor-*

ků.“ Využije-li pověřená osoba metodické postupy i v případě semenných sadů, které nejsou zařazeny do Národního programu, bude zřejmě náklady hradit z jiných zdrojů.

Před odběrem referenčních vzorků probíhá vždy komunikace mezi pracovníky pověřené osoby, vlastníkem zdroje a pracovníky určené osoby. Odběr referenčních vzorků za účelem jejich archivace zajišťují na základě předchozí dohody pracovníci určené osoby, popř. proškolení pracovníci pověřené osoby, kteří dodržují soubor základních principů (např. NOVOTNÝ et al. 2014). Odběrům jsou vždy přítomni pracovníci pověřené osoby, kteří provádějí v souladu s ustanovením zákona kontrolu sběru jako podklad pro vystavení potvrzení o původu reprodukčního materiálu.

Konkrétní postup odběru:

1. Vlastník zdroje podá pověřené osobě *Oznámení o sběru reprodukčního materiálu* na formuláři přílohy č. 9 vyhlášky č. 29/2004 Sb., ve znění pozdějších předpisů, jako výchozího materiálu pro založení semenného sadu.
2. V případě, že je semenný sad uvažován k zařazení do Národního programu, podá vlastník současně oznámení o potřebě odběru referenčních vzorků, a to určené osobě (VÚLHM, v. v. i., Strnady) a v kopii pověřené osobě koordinující Národní program (ÚHÚL Brandýs nad Labem). Forma oznámení není legislativně standardizována.
3. Odpovědní zástupci pověřené a určené osoby dohodnou konkrétní způsob provedení odběru vzorků. Odběrům jsou přímo přítomni i zástupci určené osoby v rámci metodického dozoru a zástupci pověřené osoby v rámci výkonu kontroly sběru. Pokud není z objektivních důvodů možná přítomnost pracovníka určené osoby, pomáhá po předchozí dohodě zajistit odběr vzorků proškolený zástupce pověřené osoby, od kterého je po skončení odběru zástupce určené osoby převezme.
4. V dohodnutém termínu se uskuteční odběr vzorků a jejich následný převoz do archivu referenčních vzorků umístěném na pracovišti určené osoby (VÚLHM, v. v. i., Strnady), která zajistí jejich zaevidování, prvotní zpracování a odborné uskladnění v odpovídajících podmínkách.
5. Pověřená osoba vystaví potvrzení o původu s vyznačením poznámky „odebrán referenční vzorek“. Číslo potvrzení o původu je součástí vedené evidence v archivu referenčních vzorků u určené osoby.
6. O odběru vzorků je pořízen písemný zápis, jehož nedílnou součástí je soupis odebraných vzorků s příslušným evidenčním označením, které odpovídá bu-

doucímú značení v grafickém schématu výsadby (plánku) semenného sadu. Zápis signují zástupci vlastníka, a pověřené osoby, případně, je-li přítomen, i zástupce určené osoby. Kopii každého zápisu obdrží vlastník, pověřená i určená osoba.

7. Po registraci semenného sadu, ke kterému jsou u určené osoby archivovány referenční vzorky, zašle pověřená osoba určené osobě registrační číslo sadu.

## **2.5.2 Postup provedení testu (genetického screeningu) vybraného sadu**

1. Vlastník zdroje podá žádost o uznání semenného sadu za zdroj kvalifikovaného reprodukčního materiálu v souladu se zákonem a vyhláškou pověřené osobě.
2. V rámci uznávacího řízení může pověřená osoba rozhodnout o použití testu určenou osobou, přičemž stanoví variantu testu, počet testovaných klonů a ramet, provede náhodný výběr evidenčních čísel klonů a pozic ramet ve schématu výsadby.
3. Na základě oslovení určené osoby pověřenou osobou je provedeno odebrání příslušných vzorků ramet pro testování určenou osobou za účasti zástupců pověřené osoby a vlastníka.
4. Po odběru vzorků je bez zbytečného odkladu proveden DNA test určenou osobou.
5. Určená osoba vypracuje zprávu o výsledku testu a předá ji bez zbytečného odkladu pověřené osobě.
6. Pověřená osoba provede vyhodnocení testu a rozhodne o dalším postupu (uznání × neuznání sadu za zdroj kvalifikovaného reprodukčního materiálu, příp. další testování a náprava chyb).

## **2.5.3 Testovací varianta A: Semenné sady, u kterých nejsou k dispozici referenční vzorky odebrané z ortetů, ze kterých byly založeny**

V případě starších semenných sadů je kromě případných komplikací s možností použití v nich produkovaného reprodukčního materiálu v důsledku dřívějšího způsobu výběru zdrojových ortetů pro založení sadu, který není v souladu s dnes platnou legislativou (zákon č. 289/1995 Sb., vyhláška č. 139/2004 Sb.), nutno upozornit na fakt, že vysazené klony (ramety) již ve většině případů není možno po-

rovnat se zdrojovým jedincem (dřívější terminologií označovaným jako výběrový strom, stávající terminologií pak jako ortet, popřípadě rodič rodiny). Některé z těchto stromů sice dosud existují, ale k provedení analýz DNA pro účely kontroly by z nich bylo nutné uskutečnit finančně náročný odběr komparačních vzorků. Ačkoliv lze někdy odběr uskutečnit s minimálními náklady (NOVOTNÝ et al. 2014), v případech vyžadujících výstup do koruny stromu by byla kontrola identity původu neúměrně finančně zatížena. Provozovatel semenného sadu by navíc mohl zpochybnit fyzickou totožnost původního ortetu a donorového jedince kontrolního vzorku, neboť dokladové vzorky k dříve uznávaným ortetům (výběrovým stromům) nejsou k dispozici a žádným jiným objektivním způsobem nelze doložit, že stromy označené v porostech jsou právě ty, z nichž v minulosti reálně pocházely rouby využité při zakládání semenných sadů. Do budoucna se nabízí např. aplikace čipů (ŠIMKOVIČ 2006). Postačují pasivní čipy vybavené z výroby unikátním ID. Na rozdíl od aktivních čipů na ně nelze zaznamenávat další informace. Veškeré potřebné údaje k označeným objektům se zanesou do příslušné databáze. Čtení pomocí čtečky je bezkontaktní. Cena čipů se v roce 2006 pohybovala od 2 do 6 USD.

Pokud jde o ramety vysazené podle schématu uloženého u pověřené osoby v okamžiku registrace semenného sadu, musí vždy platit, že všechny ramety v rámci klonu (vegetativní potomstvo téhož ortetu) jsou po genetické stránce identické.

Molekulárně-genetický postup ověřování je tedy v obdobných případech založen pouze na vzájemné genetické shodě ramet (na úrovni kontrolních markerů s vysokou mírou genetického polymorfismu pro daný druh dřeviny), které jsou v dokumentaci (designu) sadu uváděny jako klonálně shodné.

V případě, že genetická shoda ramet není molekulárními analýzami vyloučena, se má za to, že dané ramety přísluší k těmž klonu a vyhověly tak podmínce kontrolního genetického screeningu.

V případě, že je mezi rametami v rámci klonu zjištěna heterogenita, je nutno posoudit míru závažnosti zjištěného stavu.

Pokud je míra zjištěné nehomogenity klonů v rámci daného objektu neřešitelná např. výřezem nevyhovujících ramet, úpravou schématu rozmístění ramet ap., je nutno na posuzovaný semenný sad pohlížet jako na nevyhovující (z hlediska požadavků legislativy, které musí být splněny pro jeho uznání). Takový semenný sad nemůže objektivně uživatelům (odběratelům osiva) garantovat potenciálně vyšší hospodářský efekt a státu splnění požadavků na původ genetických zdrojů.

### ***Postup testu u varianty A***

Porovnávají se vzorky odebrané z ramet vybraných klonů zastoupených v semenném sadu, a to vždy ze všech ramet daných klonů.

Počet testovaných klonů je na úrovni 10 % celkového počtu klonů v sadu, minimálně pak na úrovni 5 klonů.

Testuje se ca 20 vzorků.

Hodnotí se shoda všech ramet evidenčně příslušejících každému testovanému klonu.

Není-li pro testování k dispozici větší počet ramet z důvodu jejich odumření, a testování je tak de facto znemožněno, pak s největší pravděpodobností nebyly pověřené osobě nahlášeny změny stavu příslušného semenného sadu. Zanedbání povinnosti vlastníka semenného sadu bude ÚHÚL řešit v souladu s platnou legislativou.

### **2.5.4 Testovací varianta B: Semenné sady, u kterých jsou k dispozici referenční vzorky ortetů/mateřských rodičů rodin, ze kterých byly založeny**

K eliminaci problémů uvedených v předchozí variantě je nutno proces zakládání semenných sadů lesních dřevin, u nichž chce jejich zřizovatel usilovat o finanční podporu ze strany státu, od samého počátku podřídit dohledu kontrolního orgánu.

Zakladatelé nově registrovaných semenných sadů proto musí jako jednu z podmínek získání dotace i možnosti pozdějšího uznání sadu dodat určené osobě k archivaci vzorky všech ortetů. Odevzdání těchto vzorků je zásadní pro možnost budoucí objektivní kontroly založené na zjišťování klonální identity, tj. shodě ramet deklarovaného klonu s jeho ortetem.

Ze vzorků ortetů je v laboratoři určené osoby izolována DNA, která je uchovávána v hlubokomrazicím boxu, zbylá část vzorků je pak archivována jako záloha v lyofilizovaném stavu.

### ***Postup testu u varianty B – klonální semenné sady***

Porovnávají se referenční vzorky odebrané z ortetů se vzorky jejich klonů v semenném sadu, a to vždy z jedné náhodně vybrané ramety.

Počet testovaných ortetů je na úrovni 10 % všech klonů v sadu, minimálně pak na úrovni 10 ortetů/klonů.

Testuje se ca 20 vzorků.



Hodnotí se shoda všech testovaných ortetů s náhodně vybranými rametami jim evidenčně odpovídajících klonů.

### **Postup testu u varianty B – jádrové semenné sady**

Porovnávají se referenční vzorky odebrané z mateřských rodičů rodin se vzorky jejich potomků v semenném sadu, a to vždy z jednoho náhodně vybraného potomka. Počet testovaných mateřských rodičů rodin je na úrovni 10 % všech linií v sadu, minimálně pak na úrovni 10 mateřských rodičů rodin.

Testuje se ca 20 vzorků.

Hodnotí se shoda v DNA všech mateřských rodičů rodin s jim evidenčně odpovídajícími náhodně vybranými potomky.

## **2.5.5 Algoritmus výběru ortetů/mateřských rodičů rodin a konkrétních ramet/generativních potomků**

Na základě variant semenných sadů (směsí klonů) a počtu v nich zastoupených klonů je třeba podle postupů uvedených v kapitolách 2.5.3 a 2.5.4 nejprve stanovit počet kontrolovaných klonů/linií. Aby mohl být postup používán univerzálně, stanovuje se počet klonů/linií jako procentuální podíl z jejich celkového počtu. S ohledem na únosnost nákladů je počet testovaných klonů/linií shora fixně limitován.

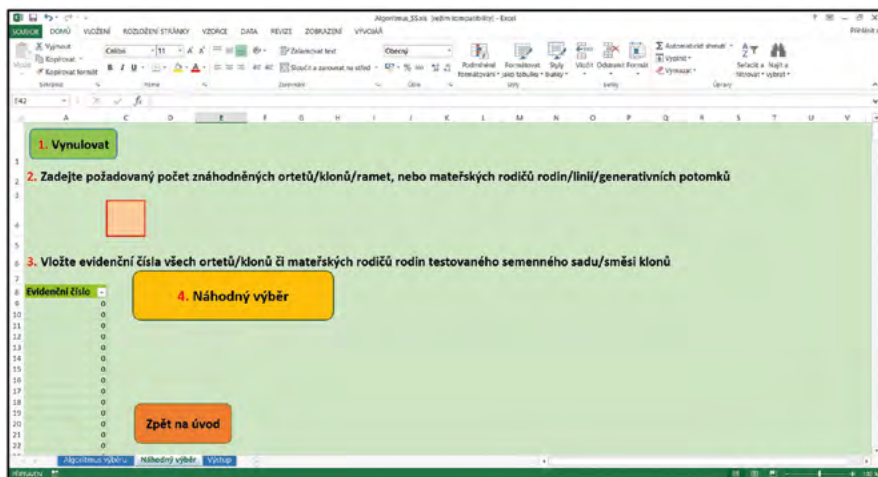
Výběr obecně probíhá ve třech navazujících krocích:

- 1) Stanovení počtu ortetů/klonů či v případě jádrových semenných sadů mateřských rodičů rodin/linií.
- 2) Náhodná selekce evidenčních čísel konkrétních ortetů/klonů, resp. mateřských rodičů rodin/linií v počtu dle předchozího kroku.
- 3) Náhodný výběr pozic konkrétních ramet, příp. generativních potomků ve schématu výsadby semenného sadu/směsi klonů.

Pro zjednodušení provedení výběru je na webových stránkách VÚLHM ([www.vulhm.cz](http://www.vulhm.cz)), na podstránce útvaru biologie a šlechtění lesních dřevin, umístěn odkaz na soubor vytvořený v programu MS Excel 2013 s nastaveným makrem umožňujícím částečně automatizovaný náhodný výběr ortetů/mateřských rodičů rodin (klonů/linií) a konkrétních ramet/generativních potomků (obr. 4). Užití tohoto nástroje lze obecně doporučit, zvláště pak v případech, kdy by vyvstaly pochybnosti při klasickém losování čísel z osudí.

Konkrétní postup výběru je potom následující:

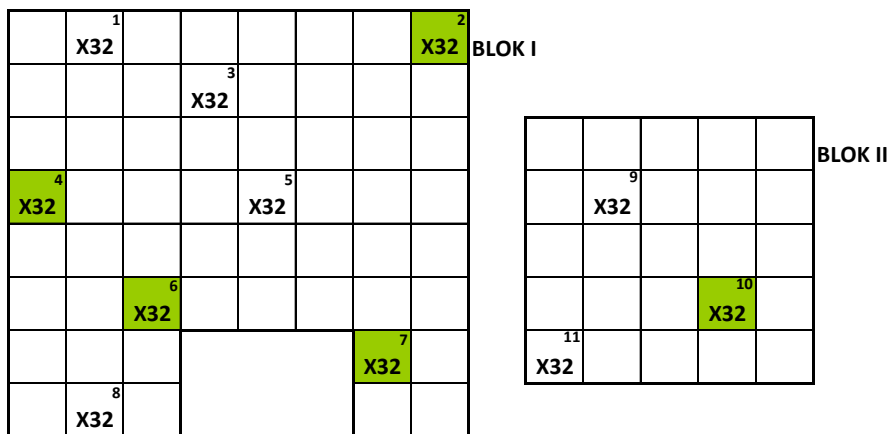
- Do označeného sloupce se vloží evidenční čísla všech ortetů/klonů či mateřských rodičů rodin/linií testovaného semenného sadu/směsi klonů.
- Na základě výsledků postupu dle kapitol 2.5.3 a 2.5.4 metodiky se do označené buňky „ZADEJTE POŽADOVANÝ POČET ZNÁHODNĚNÝCH ORTETŮ/KLONŮ/RAMET, NEBO MATEŘSKÝCH RODIČŮ RODIN/LINIÍ/GENERATIVNÍCH POTOMKŮ“ vepíše příslušný počet klonů nebo linií, který má být laboratorně ověřován pomocí analýz DNA.
- Stiskem tlačítka „NÁHODNÝ VÝBĚR“ se provede volba zadaného počtu jednotek k testování.
- Netestují-li se všechny ramety (generativní potomci) od příslušných klonů (linií), provádí se obdobným způsobem náhodný výběr jejich pozic ve schématu výsadby semenného sadu, tj. do označeného sloupce se vloží pořadová čísla či unikátní kódy všech ramet daného klonu (generativních potomků dané linie), a současně se do příslušné buňky vepíše požadovaný počet ramet/generativních potomků pro test.



**Obr. 4:** Uživatelské prostředí nástroje vytvořeného v programu MS Excel 2013 umožňujícího náhodný výběr klonů/linií, resp. ramet/generativních potomků určených k analýze DNA

- Po stisku tlačítka „NÁHODNÝ VÝBĚR“ jsou výsledkem vybraná pořadová čísla či unikátní kódy ramet/generativních potomků v požadovaném (zadaném) počtu.
- Konkrétní ramety (generativní potomci) v požadovaném počtu se na pláncu (designu, schématu výsadby) určí tak, že se postupuje zleva doprava po řádcích, přičemž se začíná od levého horního rohu pláncu. Postup takového výběru je přiblížen na obrázku 5.
- Postup náhodného výběru ramet (generativních potomků) se opakuje pro všechny testované klony (linie).

V případě, že algoritmem zvolená rameta (generativní potomek) nebude v semeném sadu z důvodů jejího odumření k dispozici, stanoví náhradní variantu odpovědný pracovník ÚHÚL, přičemž dle schématu výsadby sadu upřednostní ramety (generativní potomky) prostorově relativně vzdálenější od ostatních vybraných. Není-li v semenném sadu další živá rameta (generativní potomek) testovaného klonu k dispozici, náhradní volba se neprovádí.



**Obr. 5:** Příklad způsobu výběru čtyř ramet klonu X32 ve schématu semenného sadu pro účely testu (náhodný výběr určil k testu ramety s pořadovými čísly 2, 4, 6, 7 a 10)

## 2.5.6 Formulace rozhodnutí v závislosti na výsledcích analýz DNA

Současné znění legislativních předpisů vyžaduje v semenném sadu úplnou shodu deklarovaného původu klonů a rozmístění ramet, takže není možné testování zakončit s tolerancí jakékoliv chyby. Podle zjištěné míry pochybení lze však potřebnou nápravu odstupňovat.

- a) **Maximální počet chybných vzorků = 2.** Chyba se napraví odstraněním odlišné ramety z pozice, případně náhradní výsadbou geneticky správné ramety ze záložních sazenic. V případě uskutečnění náhradní výsadby není třeba měnit schéma rozmístění klonů v sadu. Shoduje-li se DNA ramety s jiným analyzovaným klonem, její odstranění není nutné, je však potřeba zaznamenat příslušnou změnu do schématu výsadby semenného sadu.
- b) **Počet chybných vzorků = 3 nebo 4.** Chyba se napraví odstraněním odlišné ramety z pozice, případně náhradní výsadbou geneticky správné ramety ze záložních sazenic. Následuje opakování testu ve stejném rozsahu při výběru jiných klonů a ramet k testování. V případě, že při opakovaném testu bude počet chybných vzorků maximálně 2, postupuje se dále podle bodu a), v případě, že bude počet chybných vzorků 3 či více, postupuje se podle bodu c).
- c) **Počet chybných vzorků > 4.** Chybu lze napravit zhotovením nového schématu rozmístění ramet v sadu na základě analýzy všech klonů a ramet v sadu, jinak hrozí ze strany pověřené osoby zrušení uznání. Analýzu v tomto případě hradí vlastník sadu. V případě starších semenných sadů, kde chybí informace o DNA ortetů, je nutno všechny podezřelé jedince (genotypy) nad rámec registrovaného počtu klonů/linií ze sadu odstranit.

### 3 SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Kontrolní postupy umožňující ověřování identity klonů (ramet) v semenných sadech lesních dřevin se zdrojovým jedincem (ortetem) na základě výsledků molekulárně-genetických analýz představují v ČR moderní inovační řešení, které zároveň naplňuje požadavek článku 16 směrnice Rady 1999/105/ES, aby byl reprodukční materiál jednotlivých uznaných jednotek nebo oddílů v celém průběhu počínaje jeho sklizní až po dodání konečnému spotřebiteli jasně identifikovatelný prostřednictvím stanoveného nebo schváleného systému kontrol.

Dosavadní způsob kontroly je založen pouze na důsledném a z hlediska personální kapacity náročném průběžném sledování oběhu reprodukčního materiálu od okamžiku jeho sběru až po konečné využití při obnově, resp. zakládání lesa. Exaktní důkaz, který by doložil případné porušení právního stavu, však stávající postup neumožňuje.

Ve světě pokročil kontrolní mechanismus využívající genové markery zatím nejdále v SRN (Bavorsko), nicméně ve většině jiných zemí (např. již v jiné spolkové zemi – Bádensku-Württembersku) je kontrola dosud založena pouze na hodnocení a srovnávání morfologických a růstových charakteristik.

Nově navrhovaný molekulárně-genetický přístup ke zjišťování správnosti deklarovaného původu při uznávání zdrojů kvalifikovaného reprodukčního materiálu lesních dřevin zohledňující podmínky ČR je tak dosud ve srovnání s dalšími státy spíše ojedinelý.

## 4 POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Předkládané metodické postupy ověřování deklarovaného původu klonů/ramet na principu molekulárně-genetických analýz umožňující objektivní kontrolu souladu skutečného stavu se schématem založení semenných sadů v rámci registrované dokumentace byly prioritně vypracovány na základě potřeb pracovníků pověřené osoby pro kontrolní účely, ale měly by jako informační báze zároveň sloužit i všem vlastníkům a správcům lesních majetků, kteří uvažují o založení nového semenného sadu, případně takový objekt již provozují.

Metodické postupy jsou obecně využitelné rovněž pro potřeby subjektů, jejichž pracovní zaměření souvisí s uznáváním zdrojů reprodukčního materiálu lesních dřevin. Předkládaný text popisuje možnost kontroly klonální identity pomocí molekulárně-genetických markerů jak v semenných sadech a směsích klonů zakládaných v minulosti, tak v nově zřizovaných objektech. Aplikace metodiky předpokládá provázanost s Národním programem ustanoveným v ČR na základě zmocnění zavedeného do legislativy zákonem č. 232/2013 Sb., který novelizoval zákon č. 149/2003 Sb., o obchodu s reprodukčním materiálem lesních dřevin, ve znění pozdějších předpisů.

Další skupinu uživatelů představují subjekty lesnického vzdělávání a výuky, výzkumní pracovníci, středoškolští a vysokoškolští studenti lesnických a přírodovědně zaměřených oborů, jakož i další zainteresovaní zástupci odborné veřejnosti, kteří daný text využijí v rámci své profesní činnosti.

Znalost kontrolního procesu by měla působit i jako prevence umožňující předcházet nedorozuměním či konfliktům mezi oprávněnými pracovníky provádějícími kontrolu a žadateli o uznání zdrojů reprodukčního materiálu.

## 5 EKONOMICKÉ ASPEKTY

Ekonomické zhodnocení uplatňování předložených metodických postupů se očekává v několika rovinách. V první řadě jde o přímou úsporu nákladů státu v případech nevyplacení dotací těm vlastníkům či správcům založených či registrovaných semenných sadů, které nevyhoví stanoveným požadavkům na výsledky genetického screeningu. U nově zakládaných semenných sadů přitom zavedení moderního kontrolního systému nebude pro budoucího žadatele o uznání zdroje spojeno s nárůstem finančních nákladů (předpoklad odběru referenčních vzorků z ortetů pro účely budoucích analýz společně s rouby potřebnými pro založení sadu). Univerzálnost postupu by měla pověřené osobě zodpovědné státu za realizaci kontroly umožnit samostatné rozhodnutí o počtu a způsobu odběru vzorků, aniž by bylo nutné zadávat zpracování případových studií pro konkrétní semenné sady či směsi klonů a opakovaně tak vynakládat veřejné prostředky na tentýž účel. Za zvláště významný, i když obtížně vyčíslitelný ekonomický efekt zavedení metodiky do praxe je pak nutno považovat zvýšení objemové produkce, kvality a odolnosti lesních porostů obnovovaných či zakládaných s využitím osiva z geneticky prověřených semenných sadů. V dlouhodobém horizontu by se tak měl daný přístup České republiky refundovat.

Průměrné náklady na provedení analýzy DNA jednoho vzorku (stromu) smrku ztepilého v laboratoři VÚLHM zahrnující izolaci DNA, PCR amplifikaci a fragmentační analýzu 9 nSSR lokusů v rámci 3 multiplexů činily 311 Kč včetně DPH (CVRČKOVÁ, MÁCHOVÁ 2015), u jedle bělokoré ve fázi izolace DNA 106 Kč a ve fázi získání PCR produktů a následné fragmentační analýzy (8 nSSR lokusů v rámci 2 multiplexů) 122 Kč, tj. celkem 228 Kč (CVRČKOVÁ, MÁCHOVÁ 2016), u buku lesního na izolaci 106 Kč, na PCR a fragmentační analýzu 12 nSSR lokusů v rámci 3 multiplexů 183 Kč, tj. celkem 289 Kč (CVRČKOVÁ et al. 2016), u borovice lesní na izolaci 106 Kč, na PCR a fragmentační analýzu 14 nSSR lokusů v rámci 3 multiplexů 199 Kč, tj. celkem 305 Kč (CVRČKOVÁ et al. 2017), u třešně ptačí na izolaci 106 Kč, na PCR a fragmentační analýzu 10 nSSR lokusů v rámci 3 multiplexů a 1 samostatné analýzy 154 Kč, tj. celkem 260 Kč (MÁCHOVÁ et al. 2017). Nejaktuálnější údaje o nákladech jsou uvedeny v práci o smrku ztepilém (CVRČKOVÁ et al. 2018), kde je uvažováno 109 Kč na izolaci DNA jednoho vzorku a 155 Kč na PCR a fragmentační analýzu 12 lokusů. Optimalizace postupů analýz DNA ve VÚLHM pokročila rovněž u modřínu opadavého, lípy srdčité, javoru klenu, dubu zimního, dubu letního a topolu šedého (NOVOTNÝ 2017; POKORNÁ et al. 2018). Výše uvedené náklady sice zohledňují spotřebu materiálu, chemikálií a využití přístrojového vybavení, jejich vyčíslení však odpovídá skutečnosti, že byly stanoveny v rámci řešení výzkumných projektů.

Nezahrnují tak doplňkové náklady, náklady na odpisy přístrojového vybavení, osobní náklady, náklady na optimalizaci průběhu reakcí aj. Při průzkumu možnosti využití služeb komerčních laboratoří realizovaném v rámci výše citovaných prací byly na tuzemském trhu zjištěny výhodné cenové nabídky firmy SEQme, kdy cena za analýzu 1 vzorku zahrnující PCR a fragmentační analýzu 1 multiplexu činila 200 Kč vč. DPH (rok 2015), resp. 242 Kč vč. DPH (2016, 2017). Firmě však musí být dodána vysoce kvalitní izolovaná DNA a optimalizovaný metodický postup PCR (koncentrace reagensů, teplotní režim). Pokud by měla být součástí zakázky i optimalizace PCR, byla by cena samozřejmě vyšší. Komerční laboratoře nemají ceny této služby běžně stanoveny, ale např. firma SEQme si práce tohoto charakteru účtuje sazbou 1500 Kč·hod<sup>-1</sup> (bez DPH). Cena fragmentační analýzy 1 vzorku při dodání vlastních PCR amplifikátů odpovídá u komerčních firem v průměru 72 Kč (1 multiplex). V rámci výzkumných úkolů ve VÚLHM průběžně probíhá vyhledávání a ověřování nově publikovaných markerů pro výše uvedené i další druhy dřevin s cílem metodické postupy DNA analýz postupně vylepšovat. Do budoucna lze u nákladů na provádění analýz reálně předpokládat klesající trend. Mírnou úsporu nákladů představuje rovněž provedení analýz archivovaných izolátů DNA ortetů teprve v okamžiku, kdy o to ÚHÚL požádá (neprovádění analýz u sadů, které se nepodaří zakladatelům dovést k uznávacímu řízení, resp. provedení analýz pouze u těch klonů, které skutečně v sadu fyzicky přetrvávají až do okamžiku podání žádosti o uznání).

S přechodem na novou metodu provádění kontrol dojde v porovnání s dosavadním stavem k prokazatelnému nárůstu nákladů, které však umožní objektivní a ověřitelný způsob prověření dodržování ustanovení směrnice 1999/105/ES i zákona č. 149/2003 Sb. a případné následné vyvození sankcí s nízkou možností zpochybnění. Využívání metodických postupů kontroly reprodukčního materiálu na bázi analýz DNA představuje rovněž preventivní nástroj, který by měl redukovat případné snahy vlastníků úmyslně zaměňovat vysazené jedince dřevin v semenných sadech, což ve výsledku omezí výsadby ekologicky nestabilních porostů obnovených materiálem nevhodného původu.



## 6 DEDIKACE

Metodika vznikla s podporou výzkumného projektu NAZV QJ1330240 „*Metodické postupy molekulárně-genetického ověřování původu reprodukčního materiálu lesních dřevin s cílem chránit a reprodukovat genetické zdroje lesních dřevin v rámci opatření pro zachování a rozvoj agrobiodiverzity*“ a s institucionální podporou Ministerstva zemědělství MZE-RO0118.

Podklady a konzultace ke zpracování metodiky autorům poskytli pracovníci Ústavu pro hospodářskou úpravu lesů, pobočky Hradec Králové, Ing. Miloš Pařízek, Ing. Miroslav Válek a Ing. Alžběta Pařízková. Za připomínky ke kapitole 2.4 a pomoc s překladem abstraktu a souhrnu do angličtiny autoři děkují Mgr. Radkovi Lefnarovi (VÚLHM).

## 7 LITERATURA

### 7.1 Seznam použité související literatury

- CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P. 2015. Genetická charakterizace smrku ztepilého pomocí mikrosatelitových markerů. Certifikovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 36 s. *Lesnický průvodce* 8/2015.
- CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P. 2016. Genetická charakterizace jedle bělokoré pomocí mikrosatelitových markerů. Certifikovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 34 s. *Lesnický průvodce* 5/2016.
- CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., TRČKOVÁ O. 2018. Využití mikrosatelitových markerů pro hodnocení genetické diverzity smrku ztepilého. Certifikovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 35 s. *Lesnický průvodce* 6/2018.
- CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., POLÁKOVÁ L., TRČKOVÁ O., ŽIŽKOVÁ E. 2016. Studium variability populací buku lesního pomocí mikrosatelitových markerů. Certifikovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 35 s. *Lesnický průvodce* 8/2016.
- CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., POLÁKOVÁ L., TRČKOVÁ O. 2017. Hodnocení genetických charakteristik u borovice lesní s využitím mikrosatelitových markerů. Certifikovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 43 s. *Lesnický průvodce* 4/2017.
- ERMA 2. *Evidence Reprodukčního MAteriálu lesních dřevin*. [cit. 2018-11-19]. Dostupné z WWW: <http://www.uhul.cz/nase-cinnost/reprodukcnimaterialelem-lesnich-drevin/erma>.
- IVANEK O., MARTINCOVÁ J. 2005. Klonové výsadby smrku ztepilého – izoenzymové analýzy vybraných klonů I. *Zprávy lesnického výzkumu*, 50 (1): 58–60.
- IVANEK O., MARTINCOVÁ J. 2008. Klonové výsadby smrku ztepilého – izoenzymové analýzy vybraných klonů II. *Zprávy lesnického výzkumu*, 53 (1): 52–57.
- IVANEK O., PROCHÁZKOVÁ Z. 2006. Identifikace roubovanců a klonů ve dvou semenných sadech modřínu opadavého (*Larix decidua* Mill.). *Zprávy lesnického výzkumu*, 51 (1): 38–41.
- IVANEK O., PROCHÁZKOVÁ Z. 2008. Ověření identity a testování klonů v semenných sadech borovice a modřínu s využitím genových markerů. Recenzovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 18 s. *Lesnický průvodce* 10/2008.

- IVANEK O., PROCHÁZKOVÁ Z., MATĚJKA K. 2013a. Analysis of the genetic structure of a model Scots pine (*Pinus sylvestris*) seed orchard for development of management strategies. *Journal of Forest Science*, 59 (10): 377–385.
- JELÍNKOVÁ K., ZATLOUKAL V. 2001. *Praktická příručka o tisů*. Blansko, CORTUSA: 80 s.
- KAŇÁK K. 1999. *Genetické ověřování smrkových porostů uznaných ke sběru osiva v Krkonoších*. Závěrečná zpráva za období 1997–1999. Jíloviště-Strnady, VÚLHM: 14 s., přílohy.
- KAŇÁK K. 2001. *Genetické testování původnosti porostů jedle bělokoré, smrku ztepilého a borovice lesní na území NP České Švýcarsko*. Závěrečná zpráva za období 1. 6. do 15. 12. 2000. Krásná Lípa, Správa Národního parku České Švýcarsko: 141 s.
- MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., MALÁ J. 2014. Využití mikrosatelitových markerů pro hodnocení semenného sadu smrku ztepilého. *Zprávy lesnického výzkumu*, 59 (4): 243–249.
- MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., TRČKOVÁ O., ŽIŽKOVÁ E. 2017. Využití mikrosatelitových markerů pro ověřování klonové identity u třešně ptačí. Certifikovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 40 s. *Lesnický průvodce* 10/2017.
- MALÁ J., MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., KONNERT M. 2013. Možnosti kontroly identity reprodukčního materiálu lesních dřevin využívaného při umělé obnově lesa a zalesňování pomocí analýz DNA. *Zprávy lesnického výzkumu*, 58 (4): 388–390.
- Národní program ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin na období 2019–2027*. [cit. 2018-12-27]. Dostupné z WWW: [http://eagri.cz/public/web/file/610711/Narodni\\_program\\_ochrany\\_a\\_reprodukce\\_genofondu\\_lesnich\\_drevin\\_2019\\_2027.pdf](http://eagri.cz/public/web/file/610711/Narodni_program_ochrany_a_reprodukce_genofondu_lesnich_drevin_2019_2027.pdf)
- Směrnice. 1971. *Směrnice pro zakládání semenných porostů a semenných plantáží*. Praha, MLVH: 37 s.
- Směrnice. 1988. *Směrnice pro uznávání a zabezpečení zdrojů reprodukčního materiálu lesních dřevin a pro jeho přenos*. Praha, Ministerstvo lesního a vodního hospodářství a dřevozpracujícího průmyslu ČR: 22 s.
- Směrnice Rady 1999/105/ES ze dne 22. prosince 1999 o uvádění reprodukčního materiálu lesních dřevin na trh. *Ústřední věstník Evropské unie*, 03/sv. 28 CS: 148–171.

- ŠIMKOVIČ J. 2006. RFID – identifikačné čipy v stromoch. *Lesnická práca*, 85 (1): 28–29.
- ÚHÚL. 2018. *Informace o nakládání s reprodukčním materiálem lesních dřevin České republiky 2017*. Brandýs nad Labem, ÚHÚL: 103 s.
- Vyhláška č. 139/2004 Sb., kterou se stanoví podrobnosti o přenosu semen a sazenic lesních dřevin, o evidenci o původu reprodukčního materiálu a podrobnosti o obnově lesních porostů a o zalesňování pozemků prohlášených za pozemky určené k plnění funkcí lesa. *Sbírka zákonů Česká republika*, č. 46: 1955–1963.
- Vyhláška č. 29/2004 Sb., kterou se provádí zákon č. 149/2003 Sb., o obchodu s reprodukčním materiálem lesních dřevin. *Sbírka zákonů Česká republika*, č. 9: 467–524 (ve znění pozdějších předpisů).
- Vyhláška č. 393/2013 Sb., o seznamech druhů lesních dřevin. *Sbírka zákonů Česká republika*, č. 153: 6785–6790.
- Zákon č. 149/2003 Sb., o uvádění do oběhu reprodukčního materiálu lesních dřevin lesnický významných druhů a umělých kříženců, určeného k obnově lesa a k zalesňování, a o změně některých souvisejících zákonů (zákon o obchodu s reprodukčním materiálem lesních dřevin). *Sbírka zákonů Česká republika*, č. 57: 3279–3294 (ve znění pozdějších předpisů).
- Zákon č. 232/2013 Sb., kterým se mění zákon č. 149/2003 Sb., o uvádění do oběhu reprodukčního materiálu lesních dřevin lesnický významných druhů a umělých kříženců, určeného k obnově lesa a k zalesňování, a o změně některých souvisejících zákonů (zákon o obchodu s reprodukčním materiálem lesních dřevin), ve znění pozdějších předpisů, zákon č. 634/2004 Sb., o správních poplatcích, ve znění pozdějších předpisů, a zákon č. 148/2003 Sb., o konzervaci a využívání genetických zdrojů rostlin a mikroorganismů významných pro výživu a zemědělství a o změně zákona č. 368/1992 Sb., o správních poplatcích, ve znění pozdějších předpisů, (zákon o genetických zdrojích rostlin a mikroorganismů), ve znění pozdějších předpisů. *Sbírka zákonů Česká republika*, č. 91: 2174–2193.
- Zákon č. 289/1995 Sb., o lesích a o změně a doplnění některých zákonů (lesní zákon). *Sbírka zákonů Česká republika*, č. 76: 3946–3967 (ve znění pozdějších předpisů).
- Zásady. 2018. *Zásady, pro poskytování dotací na ochranu a reprodukci genofondu lesních dřevin na období 2019–2027*. Praha, Ministerstvo zemědělství: 28 s. [cit. 2018-12-27]. Dostupné z WWW: [http://eagri.cz/public/web/file/612364/zasady\\_genofond\\_2019.pdf](http://eagri.cz/public/web/file/612364/zasady_genofond_2019.pdf).

- ZATLOUKAL V., MÁNEK J., ČURN V., KADERA J. 2001. *Inventarizace a genetická diverzita tisů červeného ve ZCHÚ ČR jako podklad pro záchranná opatření a pro jeho reintrodukcii. Závěrečná zpráva grantu VaV/610/1/99 – 3.2. za léta řešení 2000–2001.* Vimperk, Správa NP a CHKO Šumava: 119 s.
- ZAVADIL Z. 1969. *Metodika zakládání semenných plantáží.* Zbraslav nad Vltavou-Strnady, VÚLHM: 26 s. *Lesnický průvodce* 1/1969.
- ZAVADIL Z. 1982. *Semenné plantáže lesních dřevin.* Praha, SZN: 144 s.

## 7.2 Seznam publikací, které předcházely metodice

- FRÝDL J., NOVOTNÝ P., IVANEK O., BURIÁNEK V., ČÁP J. 2011. Možnosti pěstebního využití vegetativně udržovaných variant rezistentního krušnohorského smrku. Certifikovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 42 s. *Lesnický průvodce* 7/2011.
- IVANEK O., DOSTÁL J., FRÝDL J., NOVOTNÝ P., ČÁP J., BURIÁNEK V. 2013b. Metodické principy využití isoenzymových analýz při ověřování geneticky podmíněné proměnlivosti dílčích populací lesních dřevin. Certifikovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 31 s. *Lesnický průvodce* 3/2013.
- IVANEK O., NOVOTNÝ P., FRÝDL J. 2010. Metodika zakládání semenných sadů 1,5. generace. Certifikovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 29 s. *Lesnický průvodce* 7/2010.
- KAŇÁK J., FRÝDL J., NOVOTNÝ P., ČÁP J. 2008. Metodika zakládání semenných sadů. Recenzovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 24 s. *Lesnický průvodce* 9/2008.
- NOVOTNÝ P. 2013. Výhledové možnosti kontroly původu reprodukčního materiálu lesních dřevin v ČR na principu molekulárně-genetických analýz. In: Foltánek, V. (ed.): *Aktuální problematika lesního školkařství České republiky v r. 2013.* Sborník referátů. Lísek u Bystřice nad Perštejnem, Hotel Skalský Dvůr, 27. 11. 2013. Brno, Tribun EU: 21–26.
- NOVOTNÝ P. 2017. *Metodické postupy molekulárně-genetického ověřování původu reprodukčního materiálu lesních dřevin s cílem chránit a reprodukovat genetické zdroje lesních dřevin v rámci opatření pro zachování a rozvoj agrobiodiverzity.* Podkladová roční (období řešení 1. 1.–31. 12. 2017) a závěrečná (období řešení

1. 1. 2013–31. 12. 2017) zpráva projektu NAZV QJ1330240. Strnady, Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti: 65 s.

NOVOTNÝ P. 2018. Aplikace analýz DNA při ověření klonální identity v lesnictví. *Vesmír*, 97/148 (4): 195.

NOVOTNÝ P., FRÝDL J., DOSTÁL J., ČÁP J., BURIÁNEK V. 2014. Postup odběru vzorků populací lesních dřevin pro účely molekulárně-genetických analýz. Certifikovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 32 s. *Lesnický průvodce* 1/2014.

POKORNÁ E., ČÍŽKOVÁ L., MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., BURIÁNEK V., KOMÁRKOVÁ M., DOSTÁL J., ČÁP J., FULÍN M. 2018. Charakterizace genetické variability lokální populace topolu šedého (*Populus ×canescens* Aiton Sm.) s využitím SSR markerů a fenotypového hodnocení. *Zprávy lesnického výzkumu*, 63 (4): 281–289.

# **METHODOLOGY FOR VERIFICATION OF DECLARED ORIGIN OF CLONES OF FOREST TREE SPECIES IN SEED ORCHARDS BY USING MOLECULAR-GENETIC ANALYZES**

## *Summary*

The establishment and using of seed orchards is an important tool for forest tree breeding and improvement, but also for conservation and reproduction of a particular part of their gene pool. Their planting, maintenance and usage are associated with high financial costs and demands for the work organization. Therefore, big attention to the selection of source trees (ortets), administrative tasks and outdoor work associated with setting up new seed orchards should be taken into account. Seed orchard, which does not correspond to the registered documentation as for the clones composition and ramets arrangement cannot be classified as a source of qualified reproductive material.

Until recently, it has not been possible to precisely verify whether the individuals (individual clone ramets) growing in the respective positions registered in the seed orchard planting scheme really correspond to the declared origin (ortet). In the recent decades, the development of the molecular-genetic analytical methods has been giving useful tool to the state administration staff for detecting inconsistencies between real data and declared information in the request for certification of qualified reproductive material source.

The goal of this methodology is to provide simple applicable procedure for an authorized person, the Forestry Management Institute Brandýs nad Labem, to verify the genetic conformity of biological samples taken from selected clone ramets grown in registered seed orchards with origin data declared in the seed orchards accompanying documentation. The methodology is based on the DNA analyzes and it includes the procedure for verifying seed orchard establishment in two variants: 1) the verification of clone homogeneity for previously established seed orchards, i.e. conformity of DNA markers in ramets belonging to the same clone according to the seed orchard design, 2) clone identity detection in newly established seed orchards, for which reference samples of source ortets are available, i.e. ramets of the declared clone conformity with its ortet. The methodology includes the description of legislative framework process for certification of seed orchards in the

Czech Republic. Therefore, main part is focused on describing the algorithm steps related to testing (clone and ramet selection, decisions formulation). Depending on the degree of inaccuracy, corrective moves are formulated based on molecular-genetic analyzes. An Excel 2013 application has also been created to allow random selection of clones and ramets for testing, which is available for free on the internet ([www.vulhm.cz](http://www.vulhm.cz)) for contract user and other interested parties.





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

[www.vulhm.cz](http://www.vulhm.cz)

LESNICKÝ PRŮVODCE 11/2018