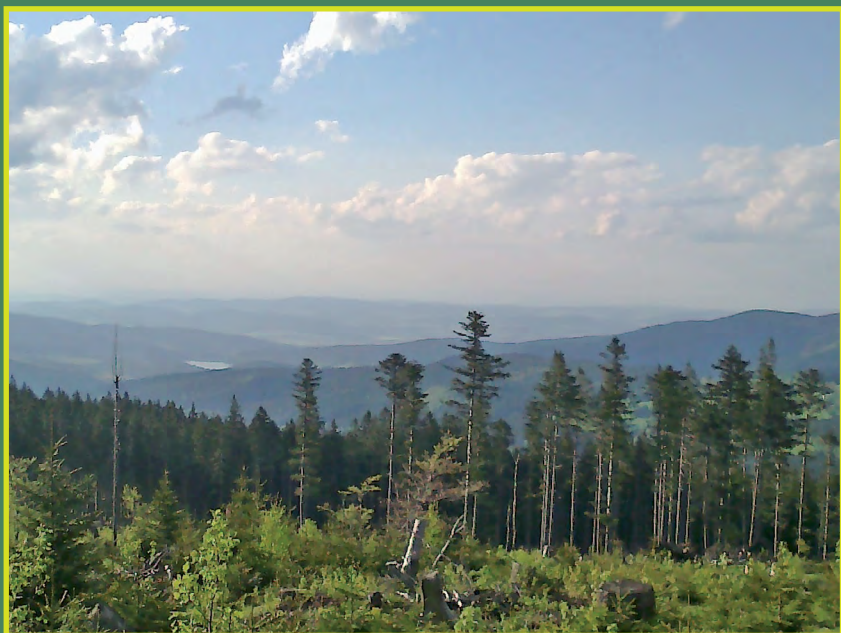


POSTUP ODBĚRU VZORKŮ POPULACÍ LESNÍCH DŘEVIN PRO ÚČELY MOLEKULÁRNĚ- GENETICKÝCH ANALÝZ

LESNICKÝ PRŮVODCE



Ing. et Ing. PETR NOVOTNÝ, Ph.D.

Ing. JOSEF FRÝDL, CSc.

Ing. JAROSLAV DOSTÁL

Ing. JIŘÍ ČÁP

RNDr. VÁCLAV BURIÁNEK



Certifikovaná metodika

1/2014

Postup odběru vzorků populací lesních dřevin pro účely molekulárně-genetických analýz

Certifikovaná metodika

Ing. et Ing. Petr Novotný, Ph.D.

Ing. Josef Frýdl, CSc.

Ing. Jaroslav Dostál

Ing. Jiří Čáp

RNDr. Václav Buriánek

Strnady 2014

Lesnický průvodce 1/2014

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

Strnady 136, 252 02 Jíloviště

<http://www.vulhm.cz>

Vedoucí redaktorka: Šárka Holzbachová, DiS.; e-mail: holzbachova@vulhm.cz

Výkonná redaktorka: Miroslava Valentová; e-mail: valentova@vulhmop.cz

Grafická úprava a zlom: Klára Šimerová; e-mail: simerova@vulhm.cz

ISBN 978-80-7417-078-2

ISSN 0862-7657

PROCEDURE OF FOREST TREE SPECIES POPULATIONS SAMPLING FOR THE PURPOSE OF MOLECULAR GENETIC ANALYSES

Abstract

The work deals with a detailed description of any necessary follow-up steps that are performed when taking biological samples from forest tree species populations and during their primary laboratory processing for the purpose of determining their genetic characteristics by using molecular-biological methods. The specifics of forest tree species sampling are mentioned, in terms of collected plant material (number of sampled individuals, phenological stage of collected samples, quality and size of samples). The attention is also paid to appropriate term (time) of sampling, to way of sampling itself (age and spacing of donor /sampled/ trees, various sampling possibilities, tools being used), registration, storage and transport of samples during collection (geographical identification of donor /sampled/ individuals, preservation biological quality of the samples), health and safety at work in forest terrain, initial laboratory processing samples and their storage in the laboratory (freezing, freeze-drying, homogenising plant tissues before the DNA isolation). The potential application of methodology and some of economic aspects are also mentioned.

Key words: population, specimen sampling, molecular analyses, DNA, allozymes, forest tree species

Oponenti: Ing. Miloš Pařízek, ÚHÚL Brandýs nad Labem
Ing. Josef Cafourek, Ph.D., Wotan Forest, a. s.

Foto na obálce:

Porosty se zastoupením jedle bělokoré na lokalitě Hojsova Stráž (J. Čáp, 28. 5. 2013)

Adresa autorů:

Ing. et Ing. Petr Novotný, Ph.D.; Ing. Josef Frýdl, CSc.; Ing. Jaroslav Dostál;
Ing. Jiří Čáp; RNDr. Václav Buriánek

Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.
Strnady 136, 252 02 Jíloviště

e-mail: pnovotny@vulhm.cz
frydl@vulhm.cz
dostal@vulhm.cz
cap@vulhm.cz
burianek@vulhm.cz

Obsah:

1	Úvod a cíl metodiky	7
2	Vlastní popis metodiky	9
2.1	Odebíraný materiál	9
2.2	Termín odběru	11
2.3	Způsob odběru	12
2.4	Bezpečnost a ochrana zdraví při práci v lesním terénu	15
2.5	Evidence, uchování a transport vzorků během odběru.....	17
2.6	Evidence, prvotní zpracování a uchovávání vzorků v laboratoři.....	17
3	Srovnání novosti postupů.....	22
4	Popis uplatnění metodiky	23
5	Ekonomické aspekty.....	24
6	Dedikace	26
7	Literatura.....	26
7.1	Seznam použité související literatury	26
7.2	Seznam publikací, které předcházely metodice	28
	Summary	30

1 ÚVOD A CÍL METODIKY

Jedním z prioritních úkolů současného lesnictví v ČR, kde lesy zaujímají více než třetinu území, je zachování biologické rozmanitosti a prosazování zásad trvale udržitelného obhospodařování lesních ekosystémů. Vzhledem k převažující umělé obnově je zajištění kvality zdrojů reprodukčního materiálu lesních dřevin základním předpokladem pro budoucí výnos, adaptační schopnost a ekologickou stabilitu lesa. Vývoj přirozených populací závisí na rozmanitosti genomů jedinců, kteří je vytvářejí. Znalost genetické struktury je důležitá zejména u ohrožených populací, které byly selektovány přírodními procesy na specifických stanovištích, kde jsou jinými populacemi nenahraditelné. Prognóza dalšího vývoje populací je uskutečnitelná především na základě znalosti jejich genetické diverzity, kterou lze stanovit pomocí molekulárních markerů.

Uvedené problematice se intenzivně věnuje řada zahraničních pracovišť zabývajících se genetickými zdroji a šlechtěním lesních dřevin. Dnes již existuje celé spektrum různých metod analýz molekulárních markerů (izoenzymové a DNA analýzy), kterými lze určit genetickou diverzitu populací.

Dostupné metody a markerovací systémy jsou použitelné u stále většího počtu rostlinných druhů. Rozšiřuje se i spektrum aplikací molekulárních technik v ekologii a taxonomii, např. při hodnocení genetické variability v souvislosti s měřítkem geografického rozšíření (THOMPSON 1999; SCHAAL, OLSEN 2000) a při studiích zaměřených na lokální populace a hodnocení detailní (jemné) genetické struktury metapopulací (MANEL et al. 2003).

Problematika uchování genetických zdrojů je trvalou součástí celoevropských aktivit zabývajících se lesy a životním prostředím (např. EUFORGEN). V ČR chybí objektivní informace o geneticky podmíněné diverzitě populací lesních dřevin. Dosavadní domácí poznatky vycházejí převážně z hodnocení provenienčních ploch a z fenotypového hodnocení porostů. Moderní metody analýz molekulárních markerů však již umožňují jejich přesné genetické zmapování.

Objektivní metody o geneticky podmíněné diverzitě populací lesních dřevin i nezávislého ověřování původu rostlinného materiálu lze v lesnictví prakticky využít např. při kontrole původu reprodukčního materiálu lesních dřevin (MALÁ et al. 2013; NOVOTNÝ 2013). V tomto směru pokročila pravděpodobně nejdále SRN (pracoviště Bavarian Office for Forest Seeding and Planting, Teisendorf), kde byla vytvořena široká databáze referenčních vzorků, které jsou odebírány již při sběru osiva a poté i v následných krocích produkce sazenic, a které jsou geneticky porovnávány pomocí izoenzymových a DNA analýz s dopěstovaným školkařským materiálem, což v současnosti představuje věrohodný způsob ověřování původu.

Jedním z nezbytných předpokladů pro úspěšná analytická stanovení je kvalita výchozího rostlinného materiálu, která závisí na dodržení správného postupu odběrů vzorků.

DNA lze izolovat téměř z libovolného pletiva obsahujícího buňky s jádry (mitochondriemi, chloroplasty). Pro uskutečnění potřebných analýz stačí i jen velmi malá množství pletiva, neboť zájmový úsek DNA lze v laboratoři namnožit do velkého množství kopií z původních několika málo molekul. U živočichů stačí např. kapka krve, stěr z ústní dutiny, vzorek trusu, odpadlých buněk pokožky, popř. i vzorek z muzejních exponátů a do určité míry i z fosilních organismů. Úspěšnost izolace DNA však vždy závisí na podmínkách uchování a je výhodou, pokud se vzorky vyskytovaly v prostředí s nižší teplotou (MUCLINGER, ZIMA 2006). U lesních dřevin izolaci DNA ztěžuje přítomnost fenolických látek, polysacharidů a dalších látek vyskytujících se v jejich pletivech.

Odběr vzorků (vzorkování) je činnost, která je procesní součástí celé řady výzkumných a kontrolních postupů. Zvlášť vysoké nároky bývají kladeny na většinu odběrů vzorků biologického charakteru, které se vyznačují řadou specifík (nutnost uchování příznivých vlastností, transport, časová tíseň aj.). Pokud jde o vzorky odebírané pro účely molekulárních analýz zaměřených na genetickou charakterizaci populací lesních dřevin, přistupují k výše uvedenému i další nároky, jako volba zdrojové populace, reprezentativní výběr donorových jedinců, obtížná dostupnost biologického materiálu pro vzorkaře aj.

Vysvětlení některých pojmů souvisejících se vzorkováním (ČÍŽEK et al. 2006):

vzorkování – činnost vedoucí k odběru a odběr reprezentativního vzorku vhodného pro daný účel;

odběr vzorku – stanovený postup odběru vzorku dle požadavků příslušné specifikace (je podmnožinou vzorkování), zahrnuje též manipulaci se vzorkem, konzervaci, uskladnění, dopravu a předání do laboratoře, včetně pořízení dokumentace této činnosti;

materiál – veškeré vzorkované matrice;

reprezentativní vzorek – vzorek, v němž je zjišťovaná vlastnost (požadovaný ukazatel) zastoupena se spolehlivostí příslušnou k cílům vzorkování;

definovaný vzorek – vzorek připravený podle předem dohodnutého a schváleného postupu zúčastněnými stranami;

vzorkař – osoba provádějící odběry, nebo se podílející na činnostech s tím souvisejících (konzervace, úprava a dělení vzorku, dokumentace a doprava vzorku do laboratoře);

vzorkovaný objekt – vymezená část materiálu v definovaném čase, která má být charakterizována reprezentativním vzorkem;

místo odběru – jednoznačně a nezaměnitelně definovaná poloha vzorkovaného objektu v zájmovém území;

bod odběru – pozice jednoznačně a nezaměnitelně definovaná prostorovými a časovými souřadnicemi, ze které je vzorek odebrán;

prostý (bodový) vzorek – samostatný podíl vzorkovaného souboru, který reprezentuje pouze jedno jediné místo v určitém čase (jeden bod odběru);

soubor – souhrn všech jednotek, které jsou předmětem zájmu.

Hlavním cílem předložené metodiky je podat ucelenou informaci o postupných krocích, které jsou nutné pro správné zajištění reprezentativního odběru biologických vzorků z účelově vybíraných populací lesních dřevin a jejich prvotního laboratorního zpracování pro potřeby stanovení genetické charakterizace populací pomocí molekulárně-genetických analýz.

2 VLASTNÍ POPIS METODIKY

2.1 Odebíraný materiál

Do výběru bývají zahrnovány především populace lesních dřevin na lokalitách, které jsou vyhlášeny jako genové základny (např. NOVOTNÝ et al. 2008; NOVOTNÝ, FRÝDL 2009; PAŘÍZEK, FRÝDL 2011), zvláště chráněná území ochrany přírody (zákon č. 114/1992 Sb.), populace představující jednotlivé ekotypy lesních dřevin (např. MACKŮ et al. 1995), zbytkové populace vzácných a ohrožených druhů, autochtonní populace (ŠINDELÁŘ et al. 2005a, b), příp. další populace, které jsou významné z hlediska předmětu specificky zaměřeného výzkumu. Při výběru lokalit je vhodné kromě původnosti a lesnického významu dílčích populací zohlednit rovněž hledisko reprezentativního zastoupení přírodních lesních oblastí a výškových pásem.

Vzhledem k tomu, že se obdobné lokality často nacházejí ve velkoplošných (NP, CHKO) či maloplošných (NPR, PR) kategoriích zvláště chráněných území, je třeba podle typu ochranného režimu získat potřebná povolení ke vstupu a možnosti odběru biologických vzorků. S dostatečným předstihem je proto nutné zaslat místně příslušným orgánům státní správy ochrany přírody a krajiny odůvodněnou žádost s vysvětlujícími informacemi o účelu odběrů, tj. nejčastěji anotaci výzkumného či ochrannářsky zaměřeného projektu. Komunikovat je třeba také s vlastníky a správci lesního majetku. V některých případech jsou ze strany úřadů stanoveny omezující

podmínky (např. zákaz používat při výstupu na stromy stupačky), které je nutno při vlastním provádění odběrů dodržovat. Může být vyžadováno i uzavření specifických smluv, jejichž obsahem většinou bývá požadavek na předání informací o výsledcích řešení výzkumného projektu získaných ve studovaném území, jehož se povolení týká.

Výjimka ze zákazu je nutná pro vjezd motorových vozidel mimo silnice a místní komunikace na celém území národních parků a chráněných krajinných oblastí, vstup mimo vyznačené cesty na území I. zón národních parků a na vjezd a vstup mimo vyznačené cesty do národních přírodních rezervací (§ 16, § 26 a § 29 zákona č. 114/1992 Sb.). Věcně příslušnými správními orgány k udělování těchto výjimek jsou správy národních parků a správy chráněných krajinných oblastí (i pro NPR mimo území CHKO). Výjimky se vydávají ve správním řízení. Po jeho zahájení je ponechána určitá lhůta (obvykle 15–30 dnů) pro vyjádření účastníků (účastníkem jsou kromě žadatele i obce, na jejichž katastru se zvláště chráněné území nachází). Po vydání rozhodnutí je ponechána 15denní lhůta pro možnost odvolání. Obecně jsou řízení ve věcech ochrany přírody (§ 83 zákona) prováděna v jednoduchých záležitostech bezodkladně, v ostatních případech do 60 dnů od zahájení řízení a ve zvláště složitých případech do 90 dnů od zahájení řízení.

Odebírané vzorky by neměly být napadené hmyzem, houbami či virovými chorobami. Na základě charakteristických vlastností jednotlivých druhů dřevin jsou odebírány pupeny, mladé listy nebo jehlice. Např. u buku lesního se osvědčil odběr pupenů, protože izolace z listů je problematická vzhledem k vysokému obsahu voskových látek. V případě obou našich základních druhů dubů se jako vhodnější jeví mladé listy, u kterých je na rozdíl od pupenů ihned rozpoznatelné případné poškození fytofágním hmyzem.

Vzorky pro izoenzymové analýzy (IVANEK et al. 2013) by měly pocházet z vitální části koruny a neměly by vykazovat známky poškození. Optimální jsou koncové části větví 20–30 cm dlouhé, u sazenic a mladých rostlin z přirozené obnovy i kratší. Postačující množství vzorků pro izoenzymové analýzy je u borovice lesní 1–3, u modřínu opadavého 5–15 dormantních pupenů, u smrku ztepilého či jedle bělokoré jde řádově o desítky pupenů (IVANEK, PROCHÁZKOVÁ 2008; IVANEK et al. 2013).

V případě zadávání analýz u akreditovaných laboratoří je zapotřebí odběr navíc přizpůsobit i dodatečným požadavkům dané laboratoře, které vyplývají z akreditovaných postupů (např. nutnost využít její vlastní vzorkaře aj.).

Pokud jde o minimální počet vzorků, který by objektivně charakterizoval genetickou strukturu populace, lze vycházet mj. z prací zaměřených na zakládání semenných sadů. Např. WRIGHT (1976) uvádí jako nejobvyklejší počet klonů v semenných sádkách 40–200, což již však často znamená zúžení genofondu vlivem selekce. Adaptabilita populací závisí na genetické diverzitě, a to zejména na přítomnosti vzácných

alel u části jejich členů, které se ve změněných podmínkách ukáží jako důležité pro přežití svých nositelů. Aby byla informace o genetické diverzitě populace relevantní, musí být při výběru podchycen dostatečný počet alel, což znamená, že výběrový soubor donorových stromů musí mít určitou minimální velikost. NAMKOONG et al. (1980) ex ZOBEL, TALBERT (1984) navrhuje jako dostatečný počet minimalizující ztráty alel 50 vzorků, přičemž k velmi vysokým ztrátám alel již dochází, klesne-li jejich počet pod 20. Je-li to možné, měl by při ochraně genofondu *ex situ* dosahovat počet jedinců 200–400. BROWN a HARDNER (2000) doporučují odběr minimálně 59 vzorků, přičemž jejich optimální počet záleží na systému opylování druhu, strategii rozmnožování aj. WHITE et al. (2007) shrnují, že k zachování alel s výskytem > 5 % alespoň v jedné kopii stačí 50–160 vzorků. Pokud by měly být spolehlivě zachyceny i vzácné alely, musely by být počty vzorků mnohem vyšší (řádově stovky, ale spíše tisíce). YANCHUK (2001) ex SKRØPPA (2005) zmiňuje, že zachování vzácných alel je možné v populacích o četnosti > 5 000. Odhad počtu efektivní velikosti populace pro udržení potřebné variability činí podle něj 30–80 jedinců. Minimální velikost výběru je však důležitá rovněž z hlediska statistického zpracování výsledků; např. MELOUN a MILITKÝ (2004) uvádějí pro normální rozdělení minimální hodnotu 50 vzorků. Za optimální počet je tedy možno považovat ca 60 odebíraných vzorků z populace; je ale třeba podotknout, že jde o počet poměrně vysoký z hlediska objemu prací spojených s prováděním analýz a potřebných finančních prostředků (vysoká spotřeba chemikálií).

2.2 Termín odběru

S typem odebíraného materiálu souvisí i vhodný termín odběru. V případě použití komerčně dostupných kitů pro izolaci DNA, např. DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), je pro odebíraní vzorků z hlediska dosažení větší výtěžnosti DNA vhodnější jarní období. U dubů se vzhledem k získanému nízkému množství vyizolované DNA z pupenů, ale i častému napadání jejich vnitřku hmyzem, osvědčily jako zdrojový materiál mladé rašící listy. V případě buku lesního jsou místo rašících listů pro další zpracování vhodnější nevyrašené nebo mírně narašené pupeny. Alternativní podzimní odběr je možný pouze u některých druhů, např. u borovice lesní a buku lesního, u jiných dřevin (SM, JD, DB, DBZ) jsou podzimní málo vyvinuté pupeny obtížné zpracovatelné a pro izolaci DNA by jich muselo být odebráno větší množství. Respektováním uvedených zjištění lze tedy zvýšit efektivitu odběrů a uspořádat finanční prostředky.

U vzorků odebíraných za účelem provedení izoenzymových analýz (dormantní pupeny, semena) je vyžadován jejich odběr v době vegetačního klidu, nejlépe v únoru

až dubnu (IVANEK, PROCHÁZKOVÁ 2008), ale v závislosti na klimatických podmínkách lokality donorového porostu lze odběry provádět v podstatě od září do května (IVANEK et al. 2013). Velký vliv na fenologii rašení dřevin má také průběh počasí v daném roce odběru, který může někdy termín prací oproti původnímu předpokladu výrazně posunout. S atypickým průběhem počasí je třeba počítat již ve fázi plánování prací a přizpůsobit tomu např. včasné zajištění potřebné vzorkovací techniky či podání žádosti o povolení ke vstupu do zvláště chráněných území ochrany přírody a odběru částí rostlin s ohledem na správní lhůty, které mají orgány státní správy ochrany přírody a krajiny ze zákona k dispozici na jejich posouzení.

2.3 Způsob odběru

Z hlediska zachycení reálného obrazu genetické diverzity populací je třeba řešit otázku vzdálenosti donorových stromů.

WRIGHT (1976) zmiňuje, že se semena a pyl často šíří pouze na krátké vzdálenosti, a proto bývají stromy v určitém okruhu blízké příbuzné, takže volba donorových jedinců zohledňující tento poznatek může zúžení genetické diverzity omezit. Lehká semena topolů, vrb nebo bříz může vítr odvést i mnoho kilometrů. Smrk, borovice a modřín dokáží vytvořit souvislý nálet do 30–40 m, řidší pak i několik set metrů od paty kmene. Ještě dále se rozšíří nálet jasanu, javoru či habru. U dřevin s těžkými semeny (dub, buk) dochází v podstatě k svislému dopadu plodů pod korunu, většinou však vlivem pohybu větví ve větru o něco dále. Rozšiřování na větší vzdálenosti zprostředkovávají především živočichové (hmyz, hlodavci, ptáci), šíření olše lepkavé se děje rovněž vodou (např. u buku lesního by posun bez pomoci živočichů dosahoval maximálně 20 m za 60 let, tj. 1 km za 3 000 let). Vzhledem k dosavadním poznatkům se však zřejmě může buk (ale např. i líska obecná) za přispění drobných živočichů šířit rychlostí 50–70 m ročně (FRIČ et al. 1946). GEBUREK (2005) cituje různé zdroje, pokud jde o schopnost kontaminace semenných sadů nebo populací lesních dřevin *in situ* cizím pylem. Jako nezbytná minimální izolační vzdálenost se jeví 500–1 000 m. U široce rozšířených druhů s masovou produkcí pylu však kontaminaci nezabrání ani několikakilometrové izolační vzdálenosti.

Minimální rozestupy mezi donorovými jedinci jsou specifikovány v odborné literatuře (NEI 1972; STERN, ROCHE 1974; RUNO et al. 2004). Obecně by měly dosahovat 30–100 m (LENGKEEK et al. 2006; EŠNEROVÁ et al. 2010), přičemž u dřevin typu jedle bělokoré se často z důvodu nedostatku disponibilních stromů blíží spodní hranici, zatímco u jiných dřevin je naopak snaha o co největší přiblížení k horní hranici. Odběry na dané lokalitě lze uskutečňovat z dospělých stromů pozemním

i lezeckým způsobem; využívání jsou však i jedinci pocházející z přirozené obnovy. V případech odběrů vzorků z generativních nebo vegetativních potomstev dílčích populací či ekotypů lesních dřevin koncentrovaných na výzkumných plochách, v semenných sadech či v klonových archivech není třeba minimální vzdálenosti mezi odebíranými jedinci dodržovat vzhledem k metodickým postupům zakládání těchto objektů, které minimalizují riziko zúžení genetické variability.

Z hlediska prostorového rozmístění je třeba posoudit nejprve mapovou situaci nad analogovým či lépe digitálním rastrem a na základě provedené rozvahy předběžně navrhnout přibližné prostorové schéma odběrů tak, aby bylo možno reprezentativně odebrat požadovaný počet vzorků ze zájmové lokality. Pokud však vzorkaři nejsou znalí místních poměrů, popř. pokud předem nebyla provedena účelová rekognoscace, je obvykle nutno pracovní návrh odběrů přímo na místě modifikovat v závislosti na konkrétních podmínkách lokality.

K samotnému odběru vzorků v lesních porostech lze doporučit teleskopické odběrové nůžky (obr. 1), kterými může průměrně vysoký člověk odstříhnout větev stromu ve výšce až 6 m bez nutnosti použití žebříku, z něhož by navíc nebylo z bezpečnostních důvodů možné ovládat nástroj oběma rukama a jehož transport lesním terénem by byl v některých případech problematický. Nůžky je navíc možné převážet uvnitř osobního automobilu.

Pomocí odběrových nůžek je ze stromu oddělena část větve požadované velikosti (disponující ca 30 pupeny, resp. rašícími listy), která je na zemi nakráčena zahradnickými nůžkami na větévký vhodný transportní délky (10–15 cm). Pokud se tímto způsobem nepodaří získat vzorky z dostatečného počtu dospělých jedinců, využijí se k odběru i jedinci z mláží či přirozeného náletu. Jedná se rovněž o příslušníky sledované populace, pouze jde o další generaci, v níž dochází k určitým změnám v zastoupení alel. Pokud je předmětem výzkumu populace jako celek, je věk donorového jedince nepodstatný, neboť ke genetickým změnám (evoluci) dochází v populacích neustále (jde o otevřený dynamický, nikoli uzavřený statický systém).

V případě využití služeb trhačských firem je situace při odběrech odlišná. K odběrům jsou na jednu stranu přístupné téměř všechny dospělé stromy s výjimkou těch, u kterých to nepřichází v úvahu z bezpečnostních důvodů (pokročilá hniloba aj.), na druhou stranu výrazně rostou náklady, časová náročnost a nároky na organizaci práce. K výstupu do korun je možné využít v podstatě jen trhačskou žebříkovou soupravu či horolezecké vybavení (obr. 2), zatímco užití lehkých pevných dvojitých žebříků či vysokozdvížných plošin není ve většině případů možné s ohledem na terénní podmínky, ve kterých se autochtonní populace dřevin často vyskytují. Stupačkové soupravy zase nelze většinou využít s ohledem na význam většiny zkoumaných populací z pohledu ochrany přírody.

Zvláštní metodu získávání vzorků větvíček pro analýzy genových markerů představuje jejich sestřelování. Ačkoliv je tento způsob tradován v literatuře, není běžně používán. Teoreticky je však sestřelování vzorků možné, neboť pro analýzy postačuje pouze malé množství rostlinných pletiv. Samozřejmostí je projednání a získání souhlasu vlastníka či správce lesního majetku, kde je odběr prováděn, jakož i subjektu realizujícího myslivecké hospodaření. K uvedenému způsobu odběru je z bezpečnostních důvodů možno použít pouze brokové střelivo (průměr broků 3–6 mm).



Obr. 1: Teleskopické odběrové nůžky firmy Fiskars dosahující při maximálním vysunutí délky 4 m (18. 11. 2013, J. Dostál)

2.4 Bezpečnost a ochrana zdraví při práci v lesním terénu

Autochtonní populace lesních dřevin se často zachovaly v těžce přístupných terénních podmínkách, které ztěžovaly lesnické hospodaření. Pracovníci, kteří provádějí odběry vzorků z takovýchto porostů, se proto mohou setkat s přítomností skalních výchozů a stěn, strží, vodních toků, prudkých svahů, bahnitého či zrašelinělého terénu, sypkého písku aj. Zvláště nebezpečné jsou i vyčnívající a hladké kameny a kořeny za deštivého počasí, rosy, v mlze a na mokřích či bahnitých stanovištích.



Obr. 2: Vzorkař při výstupu na strom (7. 7. 2008, J. Čáp)

Při výskytu těchto jevů je třeba dbát při pohybu terénem zvýšené opatrnosti, zejména s ohledem na skutečnost, že jsou v rukách přenášeny pracovní pomůcky (chladové boxy, odběrové nůžky ap.), což zvyšuje riziko zranění při eventuálním pádu.

Specifickým problémem je provádění výškových prací při lezení na stromy. Protože však tuto činnost většinou vykonávají pracovníci specializovaných firem, kteří absolvovali potřebná školení, není zde tomuto tématu věnována větší pozornost. Z bezpečnostních důvodů nelze na stromy vystupovat za deště, silného větru či mrazu pod $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ (LANDA 1955). Informace o zásadách bezpečnosti při pracích ve stromech lze nalézt např. na internetové adrese http://www.arboristika.cz/images/stories/odborne_texty/eac_smernice.pdf. Nejlepší prevencí před potenciálními úrazy, ale i chybami ze spěchu či stresu z důvodů nepříznivé počasí, zvýšeného výskytu hmyzu aj., je používání vhodného pracovního oděvu, obuvi a dalších ochranných prostředků, které odpovídají aktuálnímu stavu počasí a povaze lokality.

Po návratu z lesa je třeba provést osobní prohlídku za účelem vyhledání a odstranění ektoparazitů (klíšťata, kloši aj.).¹ Především klíště obecné je přenašečem dvou nebezpečných chorob – virové klíšťové encefalidity a bakteriální lymeské boreliózy. Protože jsou proti první z nich dostupné účinné vakcíny, je žádoucí, aby byli všichni vzorkaři proti tomuto onemocnění očkováni.

Terénní práce by měli provádět vždy nejméně 2 pracovníci. K přivolání lékařské pomoci slouží bezplatné tísňové linky 112 nebo 155. Je však třeba upozornit, že v některých případech (hluboké strže ap.) nebývá signál mobilních operátorů k dispozici a někdy jím nejsou pokryta ani větší, málo osídlená lesnatá území. Pro případ vzniku poranění při práci v lese je dobré připomenout, že v okolí prováděných činností často mívají terénní pracovníci k dispozici autolékárničku, která je součástí povinné výbavy každého motorového vozidla, což si ve stresové situaci nemusí hned uvědomit.

Vzorkování patří k činnostem vyžadujícím vysokou odbornost pracovníků, kteří je provádějí. Je proto důležité, aby svou kvalifikaci neustále rozvíjeli, vzdělávali se v oboru a byli schopni specializaci a úroveň vzdělání řádně doložit např. odborným životopisem, záznamy o absolvování tematicky souvisejících kurzů, odborných seminářů, školení nových vzorkovacích technik ap. (ČÍŽEK et al. 2006).

¹ Oproti široce rozšířenému mýtu netvoří zpětné háčky na hypostomu klíštěte závit, a proto je jakékoli kroucení přísátým jedincem neopodstatněné (DANIEL 1985). Při tomto nevhodném způsobu odstraňování klíšťat navíc často dochází k odtržení hlavičky, která zůstane v rance a způsobí dermatidu. Nevhodná je i počáteční aplikace např. petroleje, protože může vyvolat zpětný výron části nasáté krve smíšené se slinami klíštěte, které právě obsahují nebezpečné viry a bakterie. Správný postup odstranění klíštěte je jeho lehké uchopení, např. pomocí papírového ubrousku, a za stálého mírného tahu postupné viklání ze strany na stranu, které po určitém čase vyvolá jeho samovolné uvolnění. Teprve potom je vhodné místo přísátí potříť desinfekcí.

2.5 Evidence, uchování a transport vzorků během odběru

Před vlastním odběrem se každé lokalitě a odebíraným vzorkům přidělí jednoznačné evidenční kódy. Jedinci, ze kterých je uskutečňován odběr, jsou vždy označeni a zaměření pomocí GPS přístroje. Značení stromů se obvykle provádí na patě kmen lesnickým sprejem (trvanlivost 2–3 roky). V lese se pro výzkumné a jiné zvláštní účely postupně ukázalo jako vhodné používání modré barvy. Je-li nutné trvanlivější značení, lze doporučit nátěr latexovou barvou a v úvahu přichází i využití DYMO kleští, kdy je na ocelovou pásku vyražen požadovaný alfanumerický kód a odstřižený štítek je pomocí hřebíčků připevněn na kmen stromu. Místo budoucího upevnění štítku je však nutno nejprve očistit dráteným kartáčem, aby byla odstraněna svrchní vrstva odumřelých buněk kůry, která by později mohla samovolně odpadnout i s evidenčním štítkem.

Ke každému odebranému vzorku rostlinného materiálu z příslušného donorového stromu je na místě vyhotoven štítek opatřený datem odběru, zkratkou odebírané dřeviny, číselným kódem lokality a pořadovým číslem stromu/vzorku, případně dalšími důležitými údaji. Štítek se vkládá spolu se vzorkem do plastového sáčku, který se vhodným způsobem uzavře (zavázání, secvaknutí sešívačkou ap.). Popis štítku je nejvhodnější provést obyčejnou tužkou či lihovým fixem, které zajišťují dlouhodobou čitelnost zapsaných údajů.

Sáčky obsahující vzorky a evidenční štítky se v průběhu odběru ukládají nejprve do přenosného chladového boxu s uzavíratelným víkem (obr. 3), v němž je potřebná snížená teplota udržována pomocí několika kusů chladových destiček. V autě jsou pak vzorky přemístěny do cestovní chladničky napojené na rozvod z akumulátoru. Pokud není možné dopravit vzorky ještě téhož dne na pracoviště laboratoře, je třeba zdůraznit, že musí být po celou dobu až do okamžiku dodání zajištěno jejich uchovávání při co nejnižší teplotě.

2.6 Evidence, prvotní zpracování a uchovávání vzorků v laboratoři

Po příjezdu do laboratoře jsou chlazené vzorky ihned uloženy do chladničky, mražené do mrazicího boxu. Prvotní zpracování se většinou provádí nejpozději druhý den ráno. Jedná se o odstranění zbytků větví a obalových šupin pupenů a následné uložení extirpovaných pupenů nebo listů (jehlic) do mrazicího boxu v plastových Petriho miskách popsaných z obou stran zkratkou dřeviny, příslušným identifikač-



Obr. 3: Přenosný chladový box (6. 11. 2013, J. Dostál)



Obr. 4: Krátkodobé uchovávání vzorků v pultovém mrazicím boxu (18. 11. 2013, J. Dostál)

ním kódem populace a pořadovým číslem vzorku. K popisu se využívají lihové fixy či předtištěné samolepicí štítky. Pokud není rychlé prvotní zpracování z kapacitních důvodů možné, jsou i chlazené odběrové sáčky s celými větévkami bezprostředně po jejich dodání do laboratoře zmrazeny na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zpracování je pak o něco obtížnější, neboť je při odstraňování šupin ze zmrzlých pupenů nutno pracovat rychle, je třeba bránit rozmrazání vzorků a i samotné oddělení šupin je pracnější. Při postupu jsou proto využívány vymražené podkladové destičky, přenosné chladové boxy vybavené mrazicími vložkami, malokapacitní mrazicí boxy, v úvahu přichází i využití potravinářských chladicích stolů ap. Zpracované vzorky i nezpracovaný rostlinný materiál (se zachovaným evidenčním značením) jsou následně ukládány do pultových mrazicích boxů (obr. 4), kde jsou uchovávány až do provedení izolace DNA.



Obr. 5: Lyofilizátor – vzorky se vkládají do válcovité nádoby v horní části (3. 5. 2013, J. Dostál)

Dlouhodobé skladování vzorků v mrazicích boxech je vázáno na kontinuální přísun elektrické energie. Větší laboratoře by proto měly být standardně vybaveny záložním zdrojem elektrického proudu (naftový agregát), příp. by měly mít pro mimořádné situace dlouhodobého přerušení dodávky elektriny zpracován evakuační plán.

Optimálním způsobem dlouhodobého uchovávání vzorků v laboratoři je archivace lyofilizátů. Lyofilizace je proces vakuového sušení (mrazové sublimace), při němž se ze zmrazeného vzorku odpařuje pod vakuem voda, která se v lyofilizačním přístroji (obr. 5) namrazuje na kondenzační spirálu. Do lyofilizátoru jsou vzorky vkládány v otevřených Petriho miskách (obr. 6) na dobu 24 hodin. Po ukončení procesu jsou misky z přístroje vyjmuty, co nejrychleji zavičkovány a po stranách neprodyšně utěsněny parafilmem, aby bylo zabráněno zpětnému pohlcování vody.



Obr. 6: Vzorky buku lesního a modřínu opadavého připravené k lyofilizaci (3. 5. 2013, J. Dostál)

Utěsněné Petriho misky s lyofilizáty jsou vkládány do uzavíratelných plastových sáčků (obr. 7), které jsou opět označeny zkratkou dřeviny, identifikačním kódem populace (donorových jedinců), pořadovým číslem vzorku, případně dalšími potřebnými údaji. Sáčky jsou systematicky seřazeny podle pořadových čísel vzorků do kartonových krabic či jiných skladovacích boxů, které jsou označeny názvem dřeviny, číselným i slovním popisem populace, popř. číselným kódem projektu, v rámci kterého byly vzorky odebrány. Prostor temperovaný na pokojovou teplotu by měl být temný a dobře větraný.

Někdy se k vzorkům, které mají být lyofilizovány přidává již ve fázi odběru silikagel, popřípadě je přidáván i po procesu lyofilizace. Vlastnosti silikagelu je pak třeba kontrolovat a včas provádět jeho výměnu za vysušený. Pro izolaci se používá



Obr. 7: Lyofilizované vzorky smrku ztepilého (13. 12. 2013, J. Dostál)

čerstvý, zmražený či lyofilizovaný rostlinný materiál homogenizovaný třením s tekutým dusíkem, nebo jen mechanicky rozdrčený lyofilizovaný rostlinný materiál. Pro pupeny listnatých dřevin se osvědčilo jak tření s tekutým dusíkem, tak lyofilizace a následné mechanické rozdrčení. Při přípravě homogenátu mladých dubových listů a rozvitých bukových pupenů se jako vhodný postup ukázala lyofilizace a následné tření s dusíkem. Pupeny jehličnatých dřevin lze drtit i bez tekutého dusíku, v případě izolace z jehlic je vhodné vzorky nejprve lyofilizovat a následně rozetřít s dusíkem.

Vzorky pro analýzy izoenzymů je třeba až do provedení analýz uchovávat při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (maximálně však 3 měsíce). Lze je teoreticky skladovat i dlouhodobě, a to hlubokým zmrazením na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (IVANEK, PROCHÁZKOVÁ 2008; IVANEK et al. 2013), což je však kapacitně náročné na disponibilní prostor hlubokomrazicího boxu, a proto i ekonomicky nevýhodné.

3 SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

V ČR dosud chybí poznatky o genetické diverzitě populací lesních dřevin využitelné pro vědecké účely, ale i pro rozhodovací řízení státní správy. Výsledky získané pomocí analýz DNA domácích populací lesních dřevin lze promítnout do aktualizací právních předpisů a norem souvisejících např. s upřesňováním pravidel přenosů reprodukčního materiálu, dále do směrnic a předpisů nelegislativní povahy či do strategických a koncepčních dokumentů veřejné správy.

Odběr vzorků z porostů lesních dřevin se ve srovnání s odběry jiných vzorků vyznačuje řadou specifik, která jsou dána jednak velikostí území, které je nutno vzorkováním postihnout, jednak stromovým vzrůstem většiny donorových jedinců. Odběry je tak nutno provádět z rostlin, které mohou běžně dosahovat několika desítek metrů výšky a jejichž přístupné vegetativní orgány (pupeny, listy) se často nacházejí rovněž ve výškách řádově metrů až desítek metrů nad povrchem terénu. Také minimální vzdálenost donorových jedinců v desítkách až stovkách metrů, která je nutná z hlediska reprezentativnosti vzorků populace (zamezení problému blízké genetické příbuznosti), představuje z hlediska odběrů určitou komplikaci. Odběry vzorků lesních dřevin se proto vyznačují mimořádnou časovou náročností, kdy např. získání vzorků ze 60 donorových stromů trvá 2–3členné skupině vzorkařů celý den. S dobou trvání odběru a většinou i velkou vzdáleností lokalit porostů od analytického pracoviště se navíc zvyšují nároky na zajištění vhodné skladovací a transportní teploty odebraných vzorků, aby byla uchována jejich příznivá kvalita

až do okamžiku dodání do laboratoře. Z uvedených důvodů proto není obvykle možné na lesní dřeviny aplikovat postupy, které se běžně využívají např. u rostlinných druhů bylinného charakteru či jiných typů organismů.

Dostupné metodické návody zabývající se aplikacemi izoenzymových analýz v lesnictví (IVANEK, PROCHÁZKOVÁ 2008; IVANEK et al. 2010; FRÝDL et al. 2011) věnují způsobům odběru vzorků jen malou pozornost. Více informací obsahuje nově vydaná příručka (IVANEK et al. 2013), ale ani zde není uceleně popsán postup všech navazujících úkonů, které je nutno postupně provést nejprve v terénu a následně při přepravě vzorků a jejich prvotním zpracování v zázemí laboratoře. Nároky na vlastnosti vzorků pro DNA analýzy a analýzy izoenzymů jsou navíc odlišné, s čímž souvisí i nuance ve volbě termínu odběru z hlediska optimální fenologické fáze dozorových stromů.

4 POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Popsané metodické postupy reprezentativních odběrů biologických vzorků z populací lesních dřevin významných pro uchování genetické diverzity za účelem interpretace výsledků molekulárně-genetických analýz jsou využitelné při různých motivovaných aktivitách zaměřených na studium lesních dřevin a jejich porostů. Kromě výzkumných organizací a vzdělávacích subjektů v lesnických či přírodovědných oborech mohou být jejich uživatelem i orgány státní správy a odborné instituce, v jejichž kompetenci je ochrana přírody a krajiny, především pak záchrana, zachování a reprodukce genetických zdrojů lesních dřevin, tj. ochrana lesní biodiverzity na všech úrovních. Jedním z možných využití popsaných postupů v blízké budoucnosti může být jejich aplikace při prokazování skutečného původu reprodukčního materiálu lesních dřevin a obnovených porostů ve srovnání s původem deklarovaným ústně či písemně v průvodní dokumentaci (NOVOTNÝ 2013). Metodiku je však možno využít obecněji i při jiných činnostech, při kterých je nutno transportovat rostlinný materiál v biologicky využitelném stavu na větší vzdálenosti a zajistit jeho dlouhodobější skladování, např. při odběru vzorků pro účely naplnění Národní banky osiva a explantátů lesních dřevin (zákon č. 149/2003 Sb.) či při jiných odběrech vzorků pro založení kultur rostlinných explantátů *in vitro*.

Výsledky molekulárně-genetických analýz odebraných vzorků populací lesních dřevin s využitím popsaných metodických postupů přispějí k efektivnějšímu využívání genetických zdrojů lesních dřevin a rozšíří okruh prakticky využitelných poznatků, které mohou sloužit jako podklad při aktualizacích oblastních plánů

rozvoje lesů, vyhlásování genových základů a při novelizaci některých ustanovení lesnické legislativy (zákon č. 289/1995 Sb., zákon č. 149/2003 Sb.).

5 EKONOMICKÉ ASPEKTY

K odběrům vzorků pro účely analýz DNA není nutné soustředit se na výběr konkrétní části koruny donorového stromu (DNA je ve všech somatických buňkách rostliny identická), zatímco pro odběr vzorků určených k analýzám izoenzymů doporučují IVANEK et al. (2013) uskutečnit odběr z vitálních částí koruny, tj. většinou z koncových větví. Pro účely provádění analýz DNA tak není ani u vzrostlých stromů vždy nutné vystupovat za účelem odběru vzorků do jejich korun, ale pokud mají některé větve dostatečně nízko (např. na okrajích pasek a přirozeně vzniklých světlin, podél cest, průseků, vodních toků, poblíž horní hranice lesa ap.) postačí k odběru prodloužené, např. teleskopické nůžky (větevnick). Pokud není tento způsob odběru možný z dostatečného počtu dospělých stromů, lze potřebný rostlinný materiál pozemním způsobem odebrat i z mladších jedinců pocházejících z náletu, mlazin ap., pokud jsou součástí dané populace.

V současné době se cena, kterou požadují specializované trhačské firmy za sběr osiva z 1 stromu, pohybuje okolo 600–700 Kč za jehličnan, resp. více než 1 000 Kč za listnáč, i když může být v některých případech sklizeň z konkrétního listnatého stromu ve srovnání s jehličnatým snazší. Skutečnou výši ceny za sklizeň osiva (šišek, plodů) však ovlivňuje celá řada faktorů. Jde například o vzájemnou vzdálenost mezi stromy, z nichž je osivo sklízeno (přejezdy), dále o bohatost úrody (fruktifikaci jednotlivých stromů), možnost používat k výstupu do korun stupačky, o výšku souvisle zavěšené části kmene s větvemi s dostatečnou únosností (usnadnění a urychlení výstupu), tloušťku kmene stromu ap. Například při sklizni šišek z dospělých stromů jedle bělokore může jeden trhač v některých případech stihnout také jen 4 až 5 stromů za celý den. Při potřebě 60 vzorků by tak odběry touto rychlostí trvaly 12–15 dnů.

Je však třeba znovu zdůraznit, že při odběru vzorků potřebných pro analýzy DNA není nutno vystupovat až k vrcholu stromu, kde se většinou vyskytují plody či šišky, anebo osluněné, nejlépe vyvinuté pupeny využívané k odběrům roubů pro zakládání semenných sadů či pupenů pro zakládání explantátových kultur, resp. pro účely provádění izoenzymových analýz. Výstup, např. s využitím lanové techniky, je v tomto případě nutný jen k první zelené větvi. Vzorek je navíc získán jednorázově, tj. okamžitě po dosažení větve. Tímto způsobem uskuteční za 1 den trhač

odběry z většího počtu stromů než při sběru osiva, vždy však záleží na okolnostech a jeho fyzických schopnostech. Smluvní cena za 1 donorový strom proto může být ve srovnání s taxami za sběr osiva výrazně nižší. Pokud je stromolezec přímo součástí týmu vzorkařů, může to pro řešení projektu představovat podstatné snížení nákladů i snazší organizaci práce.

V případě potenciálního sestřelování vzorků by musela být k nákladům započítána i cena potřebného střeliva, která se pohybuje v rozmezí 5–10 Kč/1 náboj, což je o řád nižší položka ve srovnání s výstupy na stromy, přestože je většinou k úspěšnému odběru vzorku střelbu zpravidla nutné vícekrát opakovat. Odběr 60 jedinců z jedné populace by tak byl ve srovnání s pozemním odběrem navýšen např. při 3 nutných výstřelech pro získání 1 vzorku o 900–1 800 Kč. V případě rozsáhlejších projektů zahrnujících větší počet druhů dřevin a odebíraných populací by pak potenciální náklady při 3 nutných střelách/1 vzorek, 60 vzorcích/1 populaci, 10 populacích/1 druh dřeviny a 5 druzích dřevin dosahovaly již 45 000–90 000 Kč. Současně by se navíc podstatně zvýšilo riziko bezpečnosti práce a vzrostly by i náklady spojené s organizací práce (dohody s vlastníky a uživateli honiteb).

Molekulárně-genetické analýzy jsou zatím stále poměrně drahé, což je dáno především náklady na potřebné chemikálie a přístrojové vybavení. Přestože lze výše uvedeným způsobem finanční náročnost odběrů podstatně snížit, je třeba mít na zřeteli přesný účel, za kterým jsou vzorky získávány. Pokud je tedy předmětem výzkumu např. získání informace o genetických charakteristikách autochtonní populace tvořené pouze zbytkem starých stromů, pak nelze soubor jejich vzorků kontaminovat rostlinným materiálem pocházejícím z podrostu z přirozené obnovy, u něhož není shodný původ s rodičovskou populací zaručen.

Získání znalostí o genetické struktuře domácích populací lesních dřevin má značnou hodnotu z vědeckého hlediska, ale i z hlediska praktického dopadu na lesní hospodářství ČR. Využívání zdrojů reprodukčního materiálu lesních dřevin s vysokou genetickou variabilitou ve svém důsledku znamená i zvyšování stability obnovovaných či nově zakládaných lesních porostů, a tím dosahování vyšších budoucích ekonomických efektů, které jsou však obtížně vyčíslitelné. Jedná se nicméně o nezanedbatelné částky, které jsou dány rozdílnou tržní cenou dříví pocházejícího z předmyšlných a myšlných úmyslných těžeb ve srovnání s cenou dříví původem z nahodilých těžeb realizovaných v ekologicky labilních porostech postihovaných kalami abiotického či biotického původu. Zvýšení ekologické stability, adaptační schopnosti a tím i budoucího výnosu lesních porostů prostřednictvím zachovávání vysoké genetické variability domácích populací lesních dřevin je v podmínkách ČR z ekonomického hlediska zvláště významné vzhledem k převažující umělé obnově lesa.

6 DEDIKACE

Předkládaná metodika vychází z řešení výzkumných projektů NAZV QI92A248 „Využití genových základů jedle bělokoré v komplexu výzkumných opatření k ochraně a reprodukci genových zdrojů této dřeviny v lesním hospodářství České republiky“, QJ1230334 „Ověření geneticky podmíněné proměnlivosti významných populací lesních dřevin, včetně genetické inventarizace vybraných ekotypů, jako podklad pro aktualizaci souvisejících legislativních předpisů“ a 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“.

Autoři děkují Johnovi Fennessymu, M.Sc. (COFORD, Department of Agriculture, Ireland), za jazykovou revizi anglického abstraktu a souhrnu.

7 LITERATURA

7.1 Seznam použité související literatury

- BROWN A.H.D., HARDNER C.M. 2000. Sampling the gene pools of forest trees for ex-situ conservation. In: Boyle, T., Young, A., Boshier, D. (eds.): Forest conservation genetics: principles and practice. Bogor, CIFOR: 352 s.
- ČÍŽEK J., VENCELIDES Z., KOHOUT P., BERNÁTH P. et al. 2006. Vzorkovací práce v sanační geologii. Metodický pokyn. Praha, MŽP: 84 s.
- DANIEL M. 1985. Tajné stezky smrtonošů. Praha, Mladá fronta: 264 s.
- ĚŠNEROVÁ J., MÁNEK J., KOLÁŘ R. 2010. Genetická diverzita pěti populací jedle bělokoré v oblasti Šumavy. *Silva Gabreta*, 16 (1): 33–41.
- FRIČ J., MAŘAN B., PFEFFER A., SVOBODA A. 1946. Malá encyklopedie lesnictví. Stručný přehled lesnictví pro potřebu praxe. Díl I. Písek, Čs. matice lesnická: 832 s.
- GEBUREK T. 2005. Sexual reproduction in forest trees. In: Geburek, T., Turok, J. (eds.): Conservation and management of forest genetic resources in Europe. Zvolen, Arbora Publishers: 171–198.

- http://www.arboristika.cz/images/stories/odborne_texty/eac_smernice.pdf (Práce ve stromech. Zásady bezpečnosti práce. /český překlad 2. anglického vydání/. Bad Honnef, EAC: 8 s.).
- IVANEK O., PROCHÁZKOVÁ Z. 2008. Ověření identity a testování klonů v semenných sadech borovice a modřínu s využitím genových markerů. Strnady, VÚLHM: 18 s. Lesnický průvodce 10/2008.
- LANDA A. 1955. Lesní hospodářství II. Pěstění a tvorba lesa. Praha, SPN: 224 s.
- LENGKEEK A.G., MWANGI A.M., AGUFA C.A.C., AHENDA J.O., DAWSON I.K. 2006. Comparing genetic diversity in agroforestry systems with natural forests: a case study of the important timber tree *Vitex fischeri* in central Kenya. *Agroforestry Systems*, 67: 293–300.
- MACKŮ J. et al. 1995. Inventarizace ekotypů a ekodémů lesních dřevin. Brandýs nad Labem, ÚHÚL: 13 s.
- MALÁ J., CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., 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.
- MANEL S., SCHWARZ M.K., LUIKART G., TABERLET P. 2003. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, 18: 189–197.
- MELOUN M., MILITKÝ J. 2004. Statistická analýza experimentálních dat. Praha, Academia: 954 s.
- MUCLINGER P., ZIMA J. 2006. Molekulární ekologie není ekologie molekul. *Živa*, 54(92) (4): L–LI.
- NEI M. 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106: 283–292.
- RUNO M.S., MULUVI G.M., ODEE D.W. 2004. Analysis of genetic structure in *Melia volkensii* (Gurke.) populations using random amplified polymorphic DNA. *African Journal of Biotechnology*, 3 (8): 421–425.
- SCHAAL B.A., OLSEN K.M. 2000. Gene genealogies and population variation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97: 7024–7029.
- SKRØPPA T. 2005. *Ex situ* conservation methods. In: Geburek, T., Turok, J. (eds.): *Conservation and management of forest genetic resources in Europe*. Zvolen, Arbora Publishers: 567–583.
- STERN K., ROCHE L. 1974. Genetics of forest ecosystems. (Ecological studies 6). London, Chapman and Hall: 330 s.

- THOMPSON J.D. 1999. Population differentiation in Mediterranean plants: insight into colonization history and the evolution and conservation of endemic species. *Heredity*, 82: 229–236.
- WHITE T.L., ADAMS W.T., NEALE D.B. 2007. *Forest genetics*. Oxfordshire, Cambridge; CABI: 682 s.
- WRIGHT J.W. 1976. *Introduction to forest genetics*. New York, San Francisco, London; Academic Press: 463 s.
- 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. 289/1995 Sb., o lesích a o změně a doplnění některých zákonů (lesní zákon), ve znění pozdějších předpisů.
- Zákon ČNR č. 114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny, ve znění pozdějších předpisů.
- ZOBEL B., TALBERT J. 1984. *Applied forest tree improvement*. New Jersey, NC State University: 505 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. Strnady, VÚLHM: 42 s. Lesnický průvodce 7/2011.
- IVANEK O., DOSTÁL J., FRÝDL J., NOVOTNÝ P., ČÁP J., BURIÁNEK V. 2013. Metodické principy využití isoenzymových analýz při ověřování geneticky podmíněné proměnlivosti dílčích populací lesních dřevin. Strnady, VÚLHM: 31 s. Lesnický průvodce 3/2013.
- IVANEK O., NOVOTNÝ P., FRÝDL J. 2010. Metodika zakládání semenných sadů 1,5. generace. Strnady, VÚLHM: 29 s. Lesnický průvodce 7/2010.
- 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., FRÝDL J. 2009. Aktuální stav genových základů v ČR. Lesnická práce, 88 (5): 300–301.
- NOVOTNÝ P., FRÝDL J., ČÁP J. 2008. Metodické postupy pro navrhování, vyhlášení a management genových základů v lesním hospodářství České republiky. Strnady, VÚLHM: 80 s. Lesnický průvodce 8/2008.
- PAŘÍZEK M., FRÝDL J. 2011. Genové základny v České republice. Lesnická práce, 90 (12): 816–818.
- ŠINDELÁŘ J., ČÁP J., NOVOTNÝ P. 2005a. Původní populace lesních dřevin v ČR. Lesnická práce, 84 (9): 464–466.
- ŠINDELÁŘ J., ČÁP J., NOVOTNÝ P. 2005b. Význam a možnosti využívání původních (autochtonních) populací lesních dřevin v ČR. Jíloviště-Strnady, VÚLHM: 51 s. Lesnický průvodce 2/2005.

PROCEDURE OF FOREST TREE SPECIES POPULATIONS SAMPLING FOR THE PURPOSE OF MOLECULAR GENETIC ANALYSES

Summary

The conservation of biological diversity, and promoting the principles of sustainable management of forest ecosystems, such are the priority tasks of current forestry sector in the Czech Republic, where forests occupy more than a third of the territory. Due to the prevailing artificial regeneration, the requirement to ensure the forest reproductive material resources quality is the basic premise for future yield, adaptation ability and ecological stability of forest. The natural populations' development depends on diversity of the genomes of individuals which create these populations. Knowledge of the genetic structure is especially important for threatened populations, which have been selected by natural processes on specific habitats where these populations are irreplaceable by any others.

The problems of plant genetic resources conservation present a permanent part of the Pan-European activities dealing with forests and the environment (e.g. EUFORGEN Program). In the Czech Republic, there is missing objective information about genetically conditioned diversity /variability/ of forest tree species populations. The current knowledge /findings/ are coming here mostly from the evaluation of provenance plots /from provenance research/ and from phenotype evaluation of forest stands. However, modern methods of DNA analysis already allow the precise genetic mapping of population.

Genetically representative sampling of subpopulation should be carried out, in accordance with the recommended principles, from a minimal number of 60 individuals. During sampling activities, collections of samples from adult individuals are preferable, while minimum spacing being specified in the special literature is required. Basic spacing between individuals, from which collection of samples should be carried out, should achieve the distance of 30-100 m, when lower limits of these requirements are close to such tree species, as e.g. silver fir, while in case of other tree species there is effort to the closest approximation to an upper limit. Collection of samples can be made on the site from the adult trees both from the ground and by climbing. However, individuals originating from natural regeneration used to be used, as well. Regarding the methodological principles for the establishment of research plots or clonal archives, which minimise the risk of narrowing the genetic variability, it is not necessary to keep the mentioned minimal spacing between individuals of generative or vegetative origin, being sampled on these objects.

For each sample of plant material being collected from the donor tree, it is created the registration cardboard /label/ with an indication of the date of collection, of the species and its abbreviation, numeric code of the site and the serial number of the tree/sample, or with other important information, immediately on the site. This registration cardboard is placed, together with collected sample, into a plastic bag, which is necessary to close by suitable way (binding, use of stapler, etc.). The cardboard /label/ description is most suited to perform an ordinary pencil or spirit marker, which ensure long-term readability of written data.

Collected samples are stored in refrigerator, immediately after bringing them to the laboratory. Their first processing is realized as latest the second day in the morning. It is necessary to remove rests of small branches and cover scales of buds, and then to store the extirpated buds, needles, leaves into the freezer in plastic Petri dishes being described from both sides by data containing abbreviation of shrub or tree name, with the relevant identification code and with the serial number of the sample population. The spirit markers or pre-printed self-adhesive labels are being used for these purposes. If it is not the fast primary processing of samples from capacity reasons possible, sampling bags with the whole branches are frosted at the temperature of -20°C immediately after their delivery to the laboratory. Processing of samples is then a little more difficult, since it is necessary to quickly remove scales of frozen buds, to prevent the thawing of the samples and the separation of scales is more difficult. Therefore, the frosted underlying plates, portable cold boxes equipped with refrigerating inserts, small sized frosting boxes are being used. The food refrigeration tables are being considered to be used too, etc. Processed and unprocessed plant material samples (with preserved registration marking) are subsequently stored in a high volume freezing boxes, where they are stored until the DNA isolation performing itself.

The described methodological procedures of representative sampling of biological samples from forest tree species populations, which are important for conservation of forest tree species genetic diversity in order to perform molecular-genetic analyses are available /are possible to be used/ in a range of multifaceted motivated activities aimed at the study of the forest tree species and their stands. In addition to research organisations, these methodological procedures may also be used by state administration bodies and professional institutions, whose competence is the nature and landscape protection, and in particular, preservation, conservation and reproduction of forest tree species genetic resources, i.e. protection of forest biodiversity at all levels. As one of the possible utilization of the described procedures in the near future, it may be their application in proving of the true origin of the forest reproductive material and restored forest stands compared with data about their origin declared both by oral or written in the accompanying documentation. However, it is possible to use the methodology more generally as well as in other

activities, for which it is necessary to transport the plant material in the biologically available status at longer distances and ensure its long-term storage.

LESNICKÝ PRŮVODCE



Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.
www.vulhm.cz