

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Kristjan JARNI

**GENETSKA STRUKTURA GOZDNIH SEMENSKIH
OBJEKTOV DIVJE ČEŠNJE (*Prunus avium L.*) V
SLOVENIJI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Kristjan JARNI

**GENETSKA STRUKTURA GOZDNIH SEMENSKIH OBJEKTOV
DIVJE ČEŠNJE (*Prunus avium* L.) V SLOVENIJI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**GENETIC STRUCTURE OF WILD CHERRY (*Prunus avium* L.)
SEED STANDS IN SLOVENIA**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2013

Doktorska disertacija je zaključek Podiplomskega študija bioloških in biotehniških znanosti s področja gozdarstva in je bila opravljena na Katedri za gojenje gozdov Oddelka za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu senata Biotehniške fakultete z dne 27. 02. 2012 je bil za mentorja doktorske disertacije imenovan prof. dr. Robert Brus in za somentorja doc. dr. Jernej Jakše.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Jurij DIACI
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo
 in obnovljive gozdne vire

Mentor in član: prof. dr. Robert BRUS
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo
 in obnovljive gozdne vire

Somentor in član: doc. dr. Jernej JAKŠE
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Davorin KAJBA
 Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, Zavod za šumarsku
 genetiku, dendrologiju i botaniku

Datum zagovora: 27. avgust 2013

Doktorska disertacija je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Kristjan JARNI

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	GDK 165.3:176.1 <i>Prunus avium</i> L.+232.311.2(497.4)(043.3)=163.6
KG	divja češnja/ <i>Prunus avium</i> /semenski sestoj/populacija/mikrosateliti/genetska struktura/vegetativno razmnoževanje/somatske mutacije/Slovenija
KK	
AV	JARNI, Kristjan
SA	BRUS, Robert, (mentor) / JAKŠE, Jernej, (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 83
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje gozdarstva
LI	2013
IN	GENETSKA STRUKTURA GOZDNIH SEMENSKIH OBJEKTOV DIVJE ČEŠNJE (<i>Prunus avium</i> L.) V SLOVENIJI
TD	Doktorska disertacija
OP	IX, 74, 15 pregl., 21 sl., 3 pril., 111 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	S pomočjo devetih mikrosatelitskih markerjev je bila proučevana genetska variabilnost divje češnje (<i>Prunus avium</i> L.) v Sloveniji. Analiza 312 dreves iz štirih semenskih objektov je pokazala visoko genetsko variabilnost znotraj sestojev ($H_T = 0,749$) in manjšo, vendar značilno variabilnost med sestoji ($F_{ST} = 0,040$; $G'_{ST} = 0,137$). V sestoju Vipavska brda je bil odkrit velik delež dreves vegetativnega izvora. Tako je bilo med 217 analiziranimi drevesi v sestoju potrjenih le 69 različnih genotipov. Ob upoštevanju dreves generativnega izvora kaže sestoj Vipavska brda močno prostorsko–genetsko strukturo (SGS) ($Sp = 0,031$), z značilnim koeficientom sorodnosti v prvem razredu oddaljenosti (< 40 m). Z vključitvijo vseh dreves v analizo (generativni + vegetativni izvor) je intenziteta SGS v Vipavskih brdih še višja ($Sp = 0,149$), medtem ko je koeficient sorodnosti značilno različen od naključne razporeditve genotipov v sestoju do oddaljenosti 240 m. Analiza je pokazala, da so drevesa znotraj klonskih skupin močno prostorsko grupirana ter da k prostorski 'grupaciji' posameznih klonov pripomorejo tudi gozdne poti, potoki in jarki, ki predstavljajo ovire razrasti korenin ter na ta način ovirajo vegetativno razmnoževanje ob pomoči odganjkov iz korenin. V sestoju Vipavska brda so bile na posameznih lokusiih odkrite somatske mutacije, kar dodatno povečuje kompleksnost genetske strukture omenjenega sestaja. Rezultati kažejo na pomembnost upoštevanja bioloških in genetskih lastnosti vrst pri gospodarjenju z gozdovi, še posebno pri izločanju semenskih objektov. Pri njihovem izločanju moramo paziti na ustrezno genetsko variabilnost in majhno sorodno povezanost med drevesi.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ŠD	Dd
DK	FDC 165.3:176.1 <i>Prunus avium</i> L. +232.311.2(497.4)(043.3)=163.6
KG	wild cherry/ <i>Prunus avium</i> /seed stand/population/microsatellite/genetic structure/vegetative propagation/somatic mutation/Slovenia
KK	
AV	JARNI, Kristjan
SA	BRUS, Robert, (supervisor) / JAKŠE Jernej, (co-supervisor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 83
ZA	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, field Forestry
LI	2013
IN	GENETIC STRUCTURE OF WILD CHERRY (<i>Prunus avium</i> L.) SEED STANDS IN SLOVENIA
TD	Doctoral Dissertation
OP	IX, 74, 15 tab., 21 fig., 3 ann., 111 ref.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	<p>Microsatellite markers were used to describe the genetic structure of four seed stands of wild cherry (<i>Prunus avium</i> L.). 312 individuals were genotyped at nine microsatellite loci. Total genetic diversity was high ($H_T = 0,749$), while differences between stands were small but significant ($F_{ST} = 0,040$; $G_{ST} = 0,137$). There was a significant amount of clonal reproduction in the Vipavska brda stand, with only 69 genotypes identified among 217 trees. In Vipavska brda a high overall spatial–genetic structure (SGS) ($Sp = 0,031$) was observed when only sexually derived genets were considered and the kinship coefficient was only significant in the first distance class (< 40 m). When both the generative and vegetative origin of trees were included, the intensity of the SGS in Vipavska brda increased ($Sp = 0,149$), while the kinship coefficient was significantly different from a random distribution of genotypes up to the 200–240 m distance class. We determined that the spatial grouping of clones in Vipavska brda was also affected by forest paths, streams and ditches, which represent obstacles to root growth and consequently obstruct vegetative propagation via root suckers. In Vipavska brda evidence of somatic mutations within clonal groups were observed that further increased the complexity of the genetic structure in the stand. Our results demonstrate the importance of taking into account the biological and genetic characteristics of species in forest management, especially when determining new seed stands. They should be carefully selected and should possess adequate genetic variability to ensure low relatedness among seed trees.</p>

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VII
Kazalo prilog	VIII
Okrajšave in simboli	IX
1 UVOD	1
1.1 PREDSTAVITEV DIVJE ČEŠNJE (<i>Prunus avium</i> L.)	1
1.1.1 Taksonomska pripadnost in razširjenost divje češnje	1
1.1.2 Opis	3
1.1.3 Ekosistemi, habitati in gojenje vrste	4
1.2 PREGLED OBJAV	6
1.3 MOLEKULARNI MARKERJI	9
1.4 OPREDELITEV RAZISKOVALNEGA PROBLEMA	11
2 CILJI NALOGE IN RAZISKOVALNE HIPOTEZE	13
3 METODE DELA	14
3.1 IZBOR RAZISKOVALNIH OBJEKTOV IN VZORČNEGA MATERIALA	14
3.1.1 Opis raziskovalnih ploskev	14
3.1.2 Nabiranje vzorcev	16
3.2 IZOLACIJA IN MANIPULACIJA DNA	18
3.2.1 Izolacija DNA	18
3.2.2 Merjenje koncentracije in kvalitete DNA	18
3.2.3 Verižna reakcija s polimerazo	18
3.2.4 Analiza mikrosatelitev na avtomatskem sekvenatorju	20
3.2.5 Določanje velikosti alelov	21
3.3 ANALIZA PODATKOV	21
3.3.1 Vezavno neravnovesje	21
3.3.2 Hardy–Weinbergovo ravovesje	22
3.3.3 Ničelni aleli	22
3.3.4 Verjetnost identitete	22
3.3.5 Analiza genetske variabilnosti	23
3.3.6 Analiza prostorsko–genetske strukture	23
<u>Prostorsko–genetska struktura v odvisnosti od debeline dreves</u>	25

4	REZULTATI	27
4.1	VEZAVNO NERAVNOVESJE	27
4.2	HARDY–WEINBERGOVO RAVNOTEŽJE	27
4.3	NIČELNI ALELI	28
4.4	VERJETNOST IDENTITETE P_{ID}	28
4.5	VARIABILNOST MIKROSATELITSKIH LOKUSOV	30
4.6	GENETSKA VARIABILNOST ZNOTRAJ SESTOJEV	32
4.7	SEMENSKI OBJEKT VIPAVSKA BRDA	35
4.7.1	Debelinska in starostna struktura sestoja	35
4.7.2	Prostorsko–genetska struktura sestoja	37
4.7.2.1	Učinek vegetativnega razmnoževanja na prostorsko–genetsko strukturo sestoja	37
4.7.2.2	Prostorsko–genetska struktura v odvisnosti od debeline dreves	40
4.7.3	Parametri razširjanja genov v sestoju	41
4.7.4	Somatske mutacije	42
4.7.5	Naravne in umetne ovire pri vegetativnem razširjanju divje češnje v sestoju	45
5	RAZPRAVA	47
5.1	GENETSKA VARIABILNOST ZNOTRAJ SESTOJEV	47
5.2	GENETSKA VARIABILNOST MED SESTOJI	50
5.3	STRUKTURA SESTOJA VIPAVSKA BRDA	51
5.3.1	Debelinska in starostna struktura sestoja	51
5.3.2	Prostorsko–genetska struktura sestoja	52
5.3.3	Naravne in umetne ovire pri vegetativnem razširjanju divje češnje v sestoju	56
5.3.4	Somatske mutacije	57
6	SKLEPI	60
7	POVZETEK	63
8	SUMMARY	66
9	VIRI	69
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. št. 1	Proučevani mikrosatelitski lokusi in njihove značilnosti.....	19
Pregl. št. 2	Koncentracije komponent reakcijske mešanice za PCR reakcije posameznih lokusov.....	19
Pregl. št. 3	PCR profili – temperatura, trajanje in število ciklov za posamezne lokuse.....	20
Pregl. št. 4	Kazalniki genetske variabilnosti in programska oprema za njihov izračun.....	23
Pregl. št. 5	Rezultati testa odklonov od Hardy–Weinbergovega ravnotežja zaradi pomanjkanja heterozigotov.....	27
Pregl. št. 6	Rezultati testa odklonov od Hardy–Weinbergovega ravnotežja zaradi presežka heterozigotov.....	28
Pregl. št. 7	Verjetnost identitete P_{ID} in $P_{ID_{SIBS}}$ po sestojih.....	29
Pregl. št. 8	Dolžine in frekvence alelov devetih mikrosatelitskih lokusov najdenih v štirih sestojih divje češnje.....	30
Pregl. št. 9	Raznolikost jedrnih mikrosatelitskih lokusov.....	32
Pregl. št. 10	Genetska variabilnost sestojev divje češnje, kot jo kaže osem mikrosatelitskih lokusov.....	33
Pregl. št. 11	Multilokusne cenilke sestojnih genetskih razdalj F_{ST} in G'_{ST}	34
Pregl. št. 12	Osnovni kazalniki debelinske in starostne strukture sedmih najštevilčnejših klonskih skupin.....	36
Pregl. št. 13	Ocene prostorsko–genetske strukturiranosti ločeno za vsa drevesa v populaciji in za eno drevo na klon.....	39
Pregl. št. 14	Ocene parametrov razširjanja genov.....	42
Pregl. št. 15	Opažene variacije alelov na posameznih mikrosatelitskih lokusih in klonskih skupinah.....	44

KAZALO SLIK

Slika št. 1	Naravna razširjenost divje češnje.....	2
Slika št. 2	Razširjenost divje češnje v Sloveniji	3
Slika št. 3	Poleg generativnega razmnoževanja se divja češnja razmnožuje tudi vegetativno z odganjanjem iz korenin.....	4
Slika št. 4	Na licitacijah dosegajo sortimenti divje češnje visoke vrednosti.....	6
Slika št. 5	Lokacije raziskovalnih ploskev divje češnje.....	14
Slika št. 6	Določevanje prostorskih koordinat posameznih divjih češenj v Vipavskih brdih s pomočjo naprave Trimble GeoXT.....	17
Slika št. 7	Starost nekaterih najdebelejših dreves smo ugotavljali s pomočjo izvrtkov.....	26

Slika št. 8	Drevesa istega klonja so si lahko fenotipsko zelo podobna.....	29
Slika št. 9	Število alelov na 9 mikrosatelitskih lokusih glede na frekvenco pojavljanja v 163 drevesih divje češnje.....	31
Slika št. 10	Povprečne vrednosti alelnih kazalnikov v sestojih divje češnje.....	33
Slika št. 11	PCoA analiza: razpršenost dreves divje češnje vzdolž prve in druge sintetične koordinate.....	34
Slika št. 12	Razmerje $F_{ST} / (1 - F_{ST})$ med pari sestojev na logaritemski skali oddaljenosti.....	35
Slika št. 13	Frekvenčna porazdelitev dreves divje češnje po debelinskih stopnjah v sestoju Vipavska brda.....	36
Slika št. 14	Korelacijski koeficient 'r' predstavlja povezavo med razlikami v prsnem premeru in geografsko oddaljenostjo med pari dreves, katerih geografska oddaljenost spada v določen intervalni razred.....	37
Slika št. 15	Prostorsko–genetska struktura na podlagi vseh analiziranih dreves v sestoju, prikazana s koeficientom sorodnosti (F_{ij}) za 40 m razrede na logaritemski skali.....	38
Slika št. 16	Prostorsko–genetska struktura na podlagi generativnih dreves, prikazana s koeficientom sorodnosti (F_{ij}) za 40 m razrede na logaritemski skali.....	39
Slika št. 17	Prostorsko–genetska struktura znotraj dreves generativnega nastanka s prsnim premerom pod 24cm, prikazana s koeficientom sorodnosti (F_{ij}) za 40 m razrede na logaritemski skali.....	40
Slika št. 18	Prostorsko–genetska struktura znotraj dreves generativnega nastanka s prsnim premerom nad 24cm, prikazana s koeficientom sorodnosti (F_{ij}) za 40 m razrede na logaritemski skali.....	41
Slika št. 19	Porazdelitev števila alelnih razlik med genotipi dreves v sestoju.....	43
Slika št. 20	Prostorska razmestitev dreves divje češnje v populaciji Vipavska brda glede na naravne pregrade in poti.....	46
Slika št. 21	Znaka, ki nakazujeta vegetativni nastanek divje češnje, sta velika gostota dreves v sestoju in majhna razdalja med posameznimi drevesi....	49

KAZALO PRILOG

Priloga A	Rezultati testa vezavnega neravnovesja.
Priloga B	Značilnosti klonskih skupin v semenskem sestoju Vipavska brda
Priloga C	Kazalniki genetske variabilnosti mikrosatelitskih lokusov v posameznih semenskih sestojih

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AFLP	dolžinski polimorfizem namnoženih fragmentov (ang. Amplified Fragment Length Polymorphism)
bp	bazni par
d.b.h.	premer na prsni višini (ang. Diameter at Breast Height)
F_{ij}	koeficient sorodnosti (ang. kinship coefficient)
GRM	gozdni reprodukcijski material (ang. FRM, Forest Reproductive Material)
H_0	ničelna hipoteza
H_1	alternativna hipoteza
Nb	velikost soseske (ang. neighbourhood size)
PCoA	analiza glavnih koordinat (ang. Principal Coordinates Analysis)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. Polymerase Chain Reaction)
P_{ID}	verjetnost identitete (ang. Probability of Identity)
SGS	prostorsko–genetska struktura (ang. Spatial Genetic Structure)
Sp	kazalnik prostorsko–genetske strukture (Vekemans in Hardy, 2004)

1 UVOD

Slovensko gozdarstvo temelji na načelih trajnosti, mnogonamenskosti in sonaravnosti. Gospodarjenje z gozdovi in gozdnogojitvene ukrepe narekuje dolga življenska doba gozdnega drevja, pri čemer so v Sloveniji, kolikor je mogoče zagotovljene rastiščem prilagojene ekološke, fiziološke in genetske lastnosti populacij gozdnega drevja v posameznih gozdnih ekosistemih. Kljub sonaravnemu pristopu, ki z dajanjem prednosti naravnim pred umetno obnovo gozdov ohranja samoniklo rastlinstvo in genski sklad gozdnih drevesnih vrst, izvor nekaterih večinskih drevesnih vrst (npr. smreka, hrasti) v naših gozdovih ni znan. Čeprav ima umetna obnova gozdov v primerjavi z naravno v Sloveniji majhen delež, pa lahko z njim bistveno močneje vplivamo na drevesno sestavo, genetski dobiček pa tudi na genetsko strukturo obnovljenih sestojev. S pospeševanjem in vnosom spremičevalnih in manjšinskih drevesnih vrst z visoko vrednim lesom lahko vrednost sestojev močno povečamo. Tako evropske smernice (Helsinki declaration, 1993; Council Directive, 1999/105/EC) kot slovenska zakonodaja (Zakon o gozdnem reproduksijskem materialu, 2002, 2004; Pravilnik o določitvi provenienčnih območij, 2003; Kraigher in Grech, 2004) pri umetni obnovi, oziroma na področju pridelovanja, trženja in uporabe gozdnega reproduksijskega materiala (GRM) določajo in spodbujajo uporabo GRM lokalnega izvora, oziroma zahtevajo uporabo visokokvalitetnega GRM, ki je genetsko in fenotipsko primeren rastišču.

V nalogi se bomo osredotočili na divjo češnjo (*Prunus avium* L.), ki velja za gospodarsko in ekološko pomembno drevesno vrsto. Kot bo predstavljeno v nalogi, ima vrsta številne lastnosti, zaradi katerih bi jo bilo smotrno v okviru gozdnih ekosistemov pospeševati, za kar pa je prvi pogoj dobro poznavanje njenih bioloških in genetskih lastnosti.

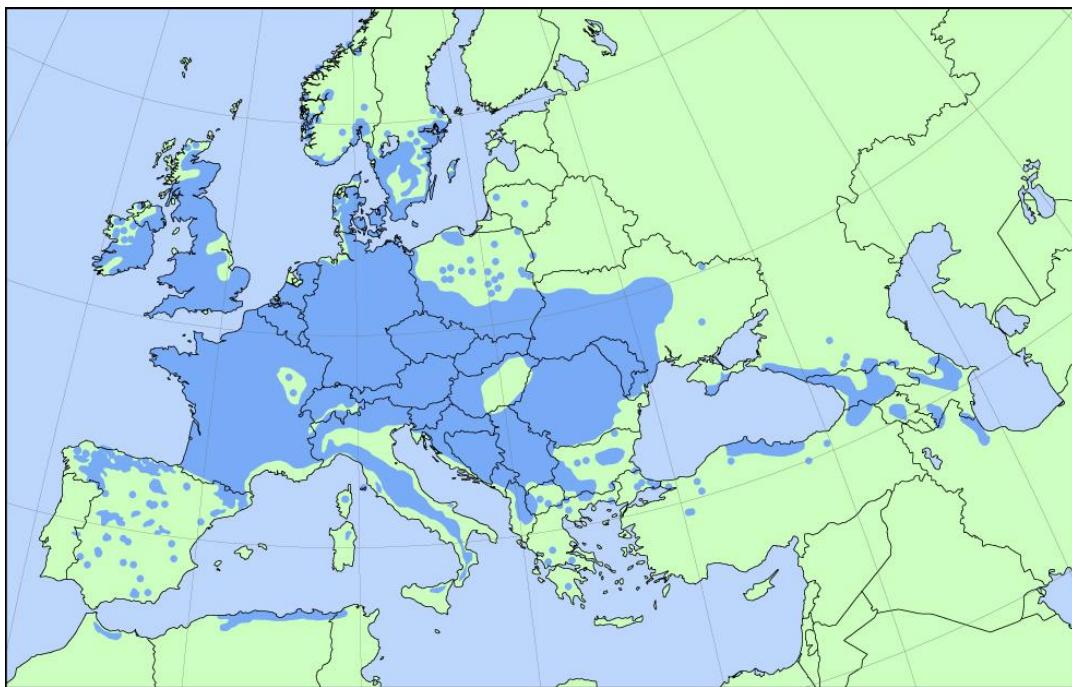
1.1 PREDSTAVITEV DIVJE ČEŠNJE (*Prunus avium* L.)

1.1.1 Taksonomska pripadnost in razširjenost divje češnje

Sistematika vrste *Prunus avium* L. (po Martinčič in sod., 2007):

deblo (Division):	Spermatophyta
poddeblo (Subdivision):	Magnoliophytina (Angiospermae)
razred (Classis):	Magnoliopsida (=Dicotyledoneae)
podrazred (Subklassis):	Rosidae
nadred (Superordo)	Rosanae
red (Ordo):	Rosales
družina (Famillia):	Rosaceae
poddružina (Subfamillia)	Prunoideae
rod (Genus):	<i>Prunus</i>
vrsta (Species)	<i>Prunus avium</i>

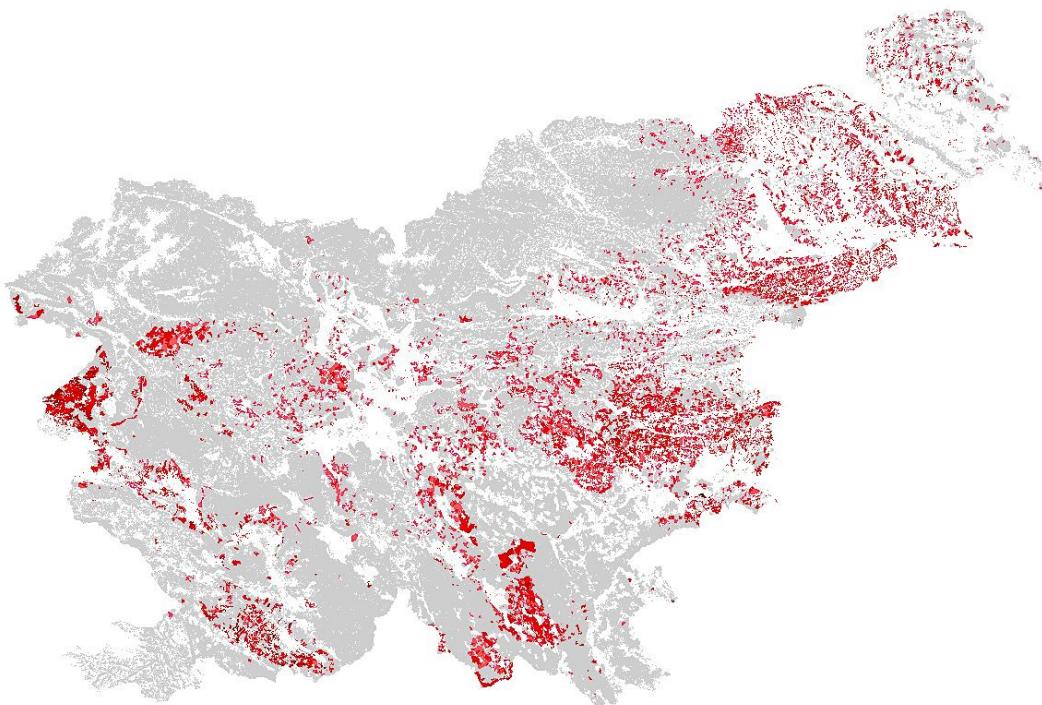
Divja češnja je vrsta zahodne Evrazije in severne Afrike (slika 1). Na severu jo najdemo na jugu Skandinavije, redka postane na vzhodu Poljske in sega tudi v Ukrajino. Na jugu uspeva na severu Iberskega polotoka, na Apeninskem polotoku, na Balkanu in v severni Afriki, raste pa tudi v severnem delu Male Azije, na Krimu, Kavkazu in v Iranu. Njene sadne sorte gojijo po vsej severni polobli (Brus, 2008; Russell, 2003).



Slika 1: Naravna razširjenost divje češnje (EUFORGEN, 2009)

Figure 1: Natural distribution of wild cherry (EUFORGEN, 2009)

V Sloveniji so naravno razširjene štiri vrste iz rodu *Prunus* (*P. avium*, *P. mahaleb* L., *P. spinosa* L., *P. padus* L.), med katerimi je najbolj pogosta divja češnja. Spada med najpomembnejše plemenite listavce v naših gozdovih, dragocena je tako za proizvodnjo visokovrednega lesa kot tudi zaradi svoje ekološke vloge v gozdnih združbah. Vrsta je naravno razširjena po vsej Sloveniji (slika 2). Najpogosteje raste v submediteranskem, predalpskem, predinarskem in subpanonskem svetu. Nad 800 m nadmorske višine je redka. Pri vrsti so pomembne tudi njene sadne sorte, ki jih gojijo v toplejših predelih po vsej Sloveniji (Brus, 2008).



Slika 2: Razširjenost divje češnje v Sloveniji (siva barva označuje gozdove) (vir: Podatki o gozdnih fondih Zavoda za gozdove Slovenije, 2001, karto pripravil A. Ficko)

Figure 2: Natural distribution of wild cherry in Slovenia (forests marked with gray) (source: database of Slovenian forest service 2001, map prepared by A. Ficko)

1.1.2 Opis

Divja češnja je hitro rastoče, do 20 m visoko in 0,5 m debelo listopadno drevo, z močno poudarjeno apikalno rastjo, razmeroma kratko življenjsko dobo in visoko vrednim in priljubljenim lesom. Izjemoma lahko doseže tudi višino 35 m in premer 120 cm (Brus, 2008; Russell, 2003). Krošnja dreves je široko konična z vodoravno izraščajočimi vejami, ki včasih rastejo v vretencih. Deblo je pogosto lepo izraženo vse do vrha krošnje in je pokrito s tanko in svetlečo skorjo s prečno posejanimi lenticelami. Pri starejših drevesih se s skorje lušči lubje v tankih prečnih trakovih, nazadnje skorja močno razpoka (Brus, 2008). Divja češnja razvije močan koreninski sistem s srčasto glavno korenino in vodoravnimi stranskimi koreninami, katerih koreninski laski so nekoliko manj aktivni (Schmid, 2006). Življenjska doba divje češnje redko znaša več kot 100 let. Za divjo češnjo so značilni dolgi in kratki poganjki: na dolgih poganjkih, ki so srednje debeli, neenakomerno rdečkastorjavo obarvani, z velikimi ovalno podolgovatimi lenticelami, so brsti posamični in zašiljeni. Iz njih se razvijejo novi poganjki z listi. Na kratkih poganjkih so brsti v skupinah, med katerimi prevladujejo bolj okroglasti cvetni brsti (Idžočić, 2005). Premenjalno razporejeni listi so enostavni, podolgovato jajčasti ali eliptični, z zašiljenim vrhom. Listni rob je žlezast in grobo dvojno nažagan. Na zgornjem delu listnega peclja ali na dolnjem delu listne ploskve sta dve rdeči žlezi. Listi so dolgi 7–12 cm in 4–7 cm široki, dolžina peclja znaša 2–5 cm. Na zgornji strani so listi temnozeleni, goli in bleščeči, spodaj svetlozeleni in najprej dlakavi goli in

dlakavi le ob žilah. Jeseni se obarvajo rumeno, oranžno ali rdeče. Stranske žile ne segajo do listnega roba, temveč so upognjene k sosednji žili. Palističi so podolgovati, nažagani in hitro odpadejo (Idžojetić, 2009). Dvospolni cvetovi so 2,5–3,5 cm široki, imajo 5–stevno cvetno odevalo z nazaj zavihanimi čašnimi in velikimi, eliptičnimi belimi venčnimi listi. Prašnikov je mnogo, plodni list je en. Cvetovi so po 2–3 združeni v sedečih kobulih. Koščičasti plodovi, češnje, dozorijo na začetku poletja. So okroglaste, okoli 1 cm debele, rdeče ali črne, sladke in dišeče. Površina koščice (endokarp) je gladka (Brus, 2008).



Slika 3: Poleg generativnega razmnoževanja se divja češnja razmnožuje tudi vegetativno z odganjanjem iz korenin (Jarni, 2008; Kolovrat)

Figure 3: Wild cherry is propagated both sexually and vegetatively via root suckers (Jarni, 2008; Kolovrat)

1.1.3 Ekosistemi, habitatati in gojenje vrste

Divja češnja ne gradi svojih gozdnih združb, temveč je najpogosteje posamezno ali v manjših skupinah primešana nižinskim gradnovo–gabrovim, dobovim, in sredogorskim bukovim gozdovom. Najbolje ji ustreza sončna, ne presuha pobočja in gozdnii robovi. Pregled fitocenoz, v katerih se divja češnja najpogosteje pojavlja, povzemamo po Kotarju in Maučiču (2000): *Ornithogalum pyrenaicum–Carpinetum* Mar., Pold. et Zup. in Mar. 94, *Carici umerosae–Quercetum petraeae* Pold. in Mar. 94, *Vaccinio myrtilli–Carpinetum betuli* (M. Wrab. 69) Mar. 94, *Abio albe–Carpinetum betuli* Mar. 94, *Asperulo–Carpinetum* M. Wrab. 69, *Piceo abietis–Quercetum roboris* (M. Wrab. 69) Mar. 94, *Hellebori nigri–Carpinetum betuli* Mar. in Wall., *Mucina et Grass* 93, *Epimedio–Carpinetum* (HT. 38) Borh. 63, *Pruno padifoliae–Carpinetum betuli* (Mar. & Zup. 84) Mar. 94, *Lonicero caprifoliae–Quercetum roboris* (Rauš

71) Mar. 94, *Hacquetio-Fagetum* Koš. 62, *Hedero-Fagetum* Koš. 94, *Vicio oroboidi-Fagetum* (HT. 38) Pocs et Borh. In Borh. 60, *Ornithogalo pyrenaici-Fagetum* Mar., Pap., Daks. et Zup. 90, *Lamio orvalae-Fagetum* (Ht. 38) Borh. 63 v večini geografskih variant, *Omphalodo-Fagetum* (Treg. 57) Mar. et al. 93 v nekaterih subasociacijah, *Ostryo-Fagetum* M. Wrab. ex Trin. 72 deloma, *Seslerio autumnalis-Fagetum* M. Wrab. ex Borh. 63 deloma, *Castaneo-Fagetum sylvaticae* (Mar. & Zup. 79) Mar. & Zup. 95 v vseh geografskih variantah in *Galio rotundifolii-Abietetum* Bartsch 40.

Divja češnja je mezofilna vrsta, ki najbolje uspeva na svežih, bogatih in topnih rastiščih, prenese pa tudi skromnejša tla. Če topote ni dovolj, seme oziroma plodovi ne dozorijo. Odgovarjajo ji nevtralna do rahlo kisla tla v območju pH od 4,5 do 7 (Schmid, 2006). Ker potrebuje za rast precej vlage, se izogiba sušnejših rastišč. Stojče vode ne prenese. Dobro prenaša poletne suše, v daljših sušnih obdobjih odvrže del svojega listja, zato je v takšnih letih širina branike ožja (Kotar in Maučič, 2000). Je svetloljubna vrsta, ki več zasenčenosti prenese samo v zgodnji mladosti, kasneje pa potrebuje več rastnega prostora. Na dodajanje svetlobe v sestoju odreagira izredno hitro in močno, vendar se njena hitra mladostna rast zgodaj izčrpa. Že pri 60 letih preneha priraščati v višino ter lahko začne trohneti. Kotar in Maučič (2000) ugotavlja, da se trohnoba pri divji češnji lahko pojavi že pri 45 letih starosti, medtem ko so po 70 letu starosti drevesa brez trohnobe le redka izjema. Kot svetloljubna vrsta ima nekaj pionirske lastnosti in hitro kolonizira odprte površine z nasemenitvijo ali s poganjki iz korenin (slika 3). Pozneje jo zaradi večje kompetitivnosti pogosto izrinejo drugi listavci. V gozdovih je pomembna tudi njena ekološka vloga, kjer odpadlo listje bogati tla in izboljšuje njihovo rodovitnost. Njeni plodovi so pomemben vir hrane številnim živalim, še posebno pticam, ki so pomembne za vzdrževanje dinamične stabilnosti celotnega ekosistema (Brus, 2008; Russell, 2003).

Češnjevina je visoko cenjen in zelo priljubljen les, ki pa na prostem ni preveč trajna. Kakovostni sortimenti dosegajo visoke cene na trgu (slika 4). Za doseganje le-teh ji je pri gojenju v sestoju potrebno pravočasno zagotoviti sproščeno krošnjo, kar je lažje dosegljivo v mladostnih razvojnih fazah do letvenjaka, ko je v predrasti, kot kasneje v starejših fazah. Specker (2006) kot primer sodobnega gojenja divje češnje predлага dvo-fazni sistem, pri katerem naj bi v prvem koraku pospeševali trebljenje vej, kar lahko dosežemo po naravni poti ali z umetnim obvejevanjem, medtem ko v drugi fazi pospešujemo debelinsko priraščanje. Z obvejevanjem naj bi začeli že v zgodnji mladosti, s čimer minimiziramo velikost ran in maksimiziramo volumen lesa brez grč. Pri prvem obvejevanju je priporočljivo odstraniti tudi močnejše veje in tiste, ki rastejo pod ostrim kotom višje v krošnji. Tudi z drugo fazo, tj. pospeševanjem debelinskega priraščanja, naj bi začeli kar se da zgodaj, začetek je omejen le z dosegom želene višine čistega debla. Ker je debelinsko priraščanje skoraj linearno povezano s širino krošnje, lahko nanj vplivamo z dodajanjem rastnega prostora izbrancem, s tem pa lahko preprečujemo tudi odmiranje spodnjega dela krošnje. Takšen način gospodarjenja naj bi zagotavljal večji delež lesa brez prisotnosti grč, večje premere dreves, enakomernejše debelinsko priraščanje in končno tudi večjo vrednost lesa (Specker, 2006).



Slika 4: Na licitacijah dosegajo sortimenti divje češnje visoke vrednosti (Jarni, 2012; Slovenj Gradec)

Figure 4: Wild cherry timber has a high value (Jarni, 2012; Slovenj Gradec)

1.2 PREGLED OBJAV

Divja češnja je vrsta, ki pripada skupini plemenitih listavcev in je kot tako predmet številnih raziskav v evropskem prostoru. Večina raziskav se izvaja v okviru programa EUFORGEN, in sicer največ v Franciji in Nemčiji, sledijo Španija, Italija, Belgija, Nizozemska in druge (Turok in sod., 1999; Kobliha, 2002; De Cuyper in sod., 2005; Maggioni in Lipman, 2006; Nocetti in sod., 2008).

Podrobneje kot genetske lastnosti divje češnje so proučene genetske lastnosti gojene češnje oziroma sadnih sort, ki pa jih lahko prenesemo tudi na divjo češnjo. Pri gojeni češnji so odkrili več monogenih in digenih lastnosti. S pomočjo tehnik označevalcev DNA je bila pri češnji razvita možnost ugotavljanja nekompatibilnosti S alelov pri novih akcесijah, ustvarjanju semenskih plantaž in proučevanju genetske variabilnosti divje in gojene češnje. Lokus S, je pri gojeni češnji z 12 znanimi aleli močno polimorfen, medtem ko jih je pri divji češnji znanih med 25–30 (Russell, 2003). Možnosti razlikovanja med gojeno in divjo češnjo ter genetski odnosi med njima so obravnavani v delih Guarino in sod. (2009), Turkec in sod. (2006), De Cuyper in sod. (2005) ter Panda in sod. (2003).

Popolna in vseobsegajoča Evropska raziskava, ki bi obravnavala populacijsko genetske lastnosti divje češnje, do sedaj še ni bila izvedena. Temu najbližja je raziskava, narejena v

Španiji, ki je zaobjemala 23 populacij iz 10 evropskih držav (Mohanty in sod., 2001). Raziskava kloroplastne DNA je odkrila 16 različnih haplotipov. Analiza okrog 9 % celotnega kloroplastnega genoma je pokazala večinoma mutacije tipa insercija–delecija in eno točkovno mutacijo. Šest haplotipov je bilo skupnih dvema ali večim populacijam, 10 haplotipov pa je bilo enkratnih. En haplotip je bil odkrit v 21 od 23 populacijah, kar morda kaže na njegov zelo star izvor. Korelacije med filogenijo haplotipov in geografsko razširjenostjo niso odkrili, odsotnost filogeografske strukture pri divji češnji pa povezujejo z daljinskim transportom genov med populacijami s pomočjo ptic, živali in človekovih aktivnosti (Mohanty in sod., 2001).

Santi in Dufour (2010) sta s pomočjo izoencimskih markerjev primerjala populacije divje češnje iz Francije in Gruzije. Iz primerjave sta ugotovila, da je gruzijske populacije, ki se nahajajo na vzhodnem robu naravne razširjenosti divje češnje, mogoče obravnavati kot dodaten vir nevtralne genetske variabilnosti, kar pa bi mogoče lahko veljalo tudi za adaptivno genetsko variabilnost, s katero bi bilo mogoče povečati genski sklad žlahtnjeneh populacij divje češnje v zahodnih državah.

Genetsko variabilnost znotraj naravnih populacij divje češnje močno zmanjšuje naravno vegetativno razmnoževanje s pomočjo poganjkov iz korenin in formiranje skupin klonov. Ducci in Santi (1997) sta pri petih gospodarjenih sestojih iz Francije in enim negospodarjenem sestaju iz Italije s pomočjo devetih izoencimskih lokusov ugotovila, da divja češnja zelo hitro kolonizira izpraznjene površine in da se v zgodnjih sukcesijskih stadijih zaradi odganjanja iz korenin formirajo goste skupine klonov. Izhajajoč iz rezultatov avtorja predlagata, da naj bi minimalna razdalja med drevesi, izbranimi za žlahtnjenje, znašala vsaj 100 m.

Z divjo češnjo v Belgiji in določanjem nekompatibilnih genotipov so se ukvarjali De Cuyper in sod. (2005). Na podlagi proučevanja 65 osebkov (akcesij, izbranih iz dveh populacij in posajenih v semensko plantažo) so odkrili 17 različnih S alelov. Pri primerjavi z gojenimi sortami češenj (Boškovič in Tobutt, 2001) so ugotovili tako kvantitativne razlike, na primer značilno različne frekvence alelov, kot tudi kvalitativne, kakršna je recimo odsotnost alelov S_4 in S_5 pri divji češnji, ki pa sta bila pri gojenih sortah zmerno pogosta. Omenjena alela bi lahko služila kot indikatorja hibridizacije z gojeno češnjo, kar bi bilo zelo uporabno pri preverjanju resnično naravnega izvora semena oziroma sadik na trgu. Proučevanje nekompatibilnih S lokusov pa naj bi bilo še posebno pomembno pri snovanju semenskih plantaž, kjer moramo z načrtovano prostorsko razporeditvijo materinskih dreves zagotoviti gametofitno združljivost. Schueler in sod. (2006) so s proučevanjem znotraj populacijske genetske strukture divje češnje primerjali uporabo nekompatibilnih S lokusov, s selektivno nevtralnimi jedrnimi mikrosateliti. Analiza je pokazala na večjo pestrost S alelov (15 alelov), medtem ko se je število alelov osmih mikrosatelitskih markerjev gibalo med 4–12. Shannonov indeks (Shannon's evenness index) je pokazal enakomernejšo frekvenčno razporeditev S alelov v

primerjavi s SSRs^a aleli. Večja alelna pestrost in enakomernejša porazdelitev S alelov v primerjavi z mikrosateliti je posledica delovanja frekvenčno–odvisne selekcije. Verjetnost uspešnega oprševanja je namreč obratno sorazmerna s pogostostjo S alela. Redki S aleli so v primerjavi z nevtralnimi markerji tako bolje zaščiteni pred izgubami zaradi genetskega zdrsa, v primerjavi z njimi pa imajo najverjetneje višjo imigracijsko uspešnost. Pri proučevanju prostorsko–genetske strukture populacije (SGS) (ang. Spatial Genetic Structure), pa so tako mikrosatelitski kot S lokus pokazali šibko, vendar značilno strukturiranost. Razlik med obema tipoma markerjev pri izkazovanju prostorsko–genetske strukture niso potrdili.

Podobno raziskavo so naredili tudi Ganopoulos in sod. (2012) v Grčiji. Primerjava S alelov z mikrosatelitskimi markerji je pokazala, da so S aleli pestrejši, da imajo enakomernejšo frekvenčno porazdelitev in da nanje deluje frekvenčno odvisna selekcija. S aleli naj bi v primerjavi z mikrosateliti kazali na večji pretok genov med populacijami (S aleli: $N_m = 6,7$ oz. mikrosateliti: $N_m = 1,2$), ter se hkrati izkazali za manj primerne pri zaznavanju genetskih struktur v populacijah.

V Veliki Britaniji so primerjali prostorsko–genetsko strukturo divje češnje v gospodarjenem in negospodarjenem gozdu (Vaughan in sod., 2007a). S pomočjo 13 mikrosatelitskih lokusov so pri obeh oblikah 'gospodarjenja' ugotovili velik delež vegetativnega razmnoževanja, pri čemer je bil v gospodarjenem gozdu delež dreves generativnega izvora znotraj tanjših dreves večji. Obratno je bilo v negospodarjenem gozdu, kjer so znotraj skupine tanjših dreves prevladovali osebki vegetativnega nastanka. Raziskava je potrdila velik učinek vegetativnega razmnoževanja na prostorsko–genetsko strukturiranost populacije divje češnje, ne glede na režim gospodarjenja. S pomočjo proučevanja fenologije dreves v sestoju so žeeli ugotoviti, ali prostorsko–genetsko strukturiranost podpira tudi samo cvetenje dreves oz. kako je s časovno usklajenostjo in dostopnostjo cvetnega prahu med posameznimi genotipskimi skupinami. Analiza je pokazala, da se cvetenje vseh dreves vsaj do neke mere prekriva, kar teoretično pomeni, da lahko vsako drevo (vsaj del cvetov) odda ali sprejme cvetni prah od katerega koli drevesa v sestoju.

Prostorsko–genetsko strukturo štirih naravnih sestojev divje češnje so proučevali v Nemčiji (Jolivet in sod., 2011). Genotipizacija odraslih dreves in pomladka s pomočjo mikrosatelitskih (8) in AFLP (ang. Amplified Fragment Length Polymorphism) (54) markerjev ter S lokusa je pokazala različne vzorce prostorsko–genetske strukturiranosti. Razlike v SGS so bile posledica razlik med populacijami, razlik v razvojni fazi dreves kot tudi občutljivosti in lastnosti uporabljenih markerjev. Za odkrivanje SGS so se kot najučinkovitejši izkazali AFLP markerji. SGS je bila najizrazitejša med odraslimi osebki v gostejših populacijah, kar nakazuje na manjši pretok genov v gostejših populacijah. Gostota osebkov v populacijah naj bi po izsledkih raziskave tako služila kot indikator za SGS.

^a Pogosto uporabljena kratica za mikrosatelite, ki izhaja iz angleškega izraza 'Simple Sequence Repeats', druga pogosto uporabljena kratica za mikrosatelite je STRs 'Short Tandem Repeats'

Stoeckel in sod. (2006) so pri divji češnji proučevali fenomen heterozigotnega presežka v njenih naravnih populacijah. Ocene štirih možnih hipotez fenomena so preverjali s pomočjo osmih mikrosatelitskih in S lokusa: i) učinek majhne populacije, ii) učinek heteroze, iii) učinek nekompatibilnega sistema in iv) učinek nespolnega razmnoževanja. Kljub teoretično možni drugačni razlagi so na podlagi empiričnih podatkov kot razlog heterozigotnega presežka lahko potrdili le učinek nespolnega razmnoževanja.

Guarino in sod. (2009) so s pomočjo mikrosatelitskih markerjev proučevali genetsko variabilnost gojene češnje v Italiji (60 akcесij) in jih primerjali s 27 tujimi akcесijami, kot tudi s 50 drevesi iz petih naravnih populacij. Vzorci 10 dreves so bili vzeti tudi iz naravne slovenske populacije z območja Slavnika. Analiza je potrdila veliko variabilnost SSR markerjev ter šibko razlikovanje populacij s Slavnika in Medvednice (Hrvaška) od ene populacije iz severne Italije in dveh iz Apeninov. Rezultati so med drugim pokazali na nejasno razlikovanje med gojeno in divjo češnjo.

V Grčiji so Avramidou in sod. (2010) s pomočjo 14 mikrosatelitskih markerjev analizali 36 plus dreves iz 4 populacij. Vzorec genetske variabilnosti jih je na eni strani omogočil identifikacijo posameznih dreves in na drugi relativno jasno razlikovanje med posameznimi populacijami. Z analizo glavnih koordinat so s pomočjo 11 mikrosatelitskih markerjev pokazali tudi na jasno razlikovanje med drevesi divje češnje in petimi pogostimi kultivarji gojene češnje.

Na Hrvaškem so proučevali genotipsko raznolikost 24 selekcioniranih plus dreves iz treh različnih območij severozahodne Hrvaške. S pomočjo 15 mikrosatelitskih markerjev so potrdili visoko genetsko raznolikost, ki je bila večinoma posledica razlik med drevesi znotraj regij (95,9 %) in manj posledica razlik med regijami (Tančeva–Crmarić in sod., 2011).

Na podlagi merjenja 8 morfoloških znakov na listih in 8 znakov na plodovih so poskušali razlikovati 22 populacij divje češnje v Bosni in Hercegovini (Ballian in sod., 2012). Od vseh proučevanih znakov so se sicer kot najbolj diferencialni izkazali znaki merjeni na plodovih, ki pa bistvenih razlik med populacijami niso pokazali. Kljub temu, da tega v raziskavi niso ugotavljalni, pa avtorji razloge za majhno populacijsko diferenciranost v veliki meri pripisujejo velikemu pretoku genov med populacijami.

1.3 MOLEKULARNI MARKERJI

Tradicionalno vrednotenje genetske variabilnosti zajema opise morfoloških lastnosti. Vrsto let so bili edini primerni genetski markerji pri drevesnih vrstah redke morfološke lastnosti, ki so bile pod kontrolo alelov na enem samem lokusu. V začetku 70-tih let 20. stoletja se je z razvojem biokemijskih markerjev, predvsem izoencimov, zanesljivost ocen variabilnosti povečala. Še večji napredek pa je bil dosežen z razvojem molekularnih tehnik, ki omogočajo ugotavljanje genetske variabilnosti na ravni DNA (Božič in sod., 2000).

Tehnika verižne reakcije s polimerazo (PCR – Polymerase Chain Reaction) je *in vitro* pomnoževanje specifičnih DNA zaporedij. S termično stabilno DNA polimerazo simultano podaljšujemo začetna oligonukleotida, ki sta komplementarna določenemu zaporedju DNA, sta si nasprotna in dovolj blizu. S tehniko PCR se je nadvse povečala hitrost in učinkovitost v odkrivanju vseh vrst variabilnosti DNA.

Mikrosatelitska zaporedja DNA so sestavljena iz enega do šest nukleotidov dolgih ponavljačih se zaporedij in spadajo med najbolj variabilne sekvene genomske DNA. To izkoriščamo za razvoj mikrosatelitskih markerjev. Visok polimorfizem izhaja iz variabilnosti v številu tandemskih ponovitev, kar se odrazi v skupni dolžini alela. Najpogostejsi vzrok mutacij na mikrosatelitskih lokusih je zdrs polimeraze med podvojevanjem DNA. Nekatere od tovrstnih napak se sicer odstranijo v procesu ekskizijskega popravljanja (ang. exonucleolytic proofreading) ali v procesu popravljanja napačnih parov (ang. mismatch repair), številne med njimi pa se popravljanju izognejo in postanejo mutacije (Eisen, 1999). Mikrosatelitski markerji so pogosto uporabljeni v populacijskih raziskavah. To jim omogočajo njihove lastnosti, kot so npr.:

- številčnost in razporejenost po celotnem genomu,
- večinoma se nahajajo v nekodirajočih regijah, zaradi česar so selekcijsko nevtralni,
- kodominantnost,
- pri sorodnih vrstah so pogosto identični, zaradi česar je omogočen prenos začetnih oligonukleotidov in protokolov,
- za analize je potrebna majhna količina materiala,
- zagotovljena je ponovljivost in
- možnost multipleksiranja (istočasna uporaba začetnih oligonukleotidov za dva ali več različnih lokusov, pod pogojem, da so lokusi med seboj dovolj oddaljeni).

Uporabljajo se na primer pri proučevanju genetskih struktur populacij (Heuertz in sod., 2001; Schueler in sod., 2006; Vaughan in sod., 2007a; Jolivet in sod., 2011), pretoku genov (Heuertz in sod., 2003; Garcia in sod., 2005), filogeografskih študijah (Heuertz in sod., 2004a, 2006), pri analizah starševstva in hibridizacij (Morand-Prieur in sod., 2002, Westergren, 2010) idr. Posebno pozornost pri interpretaciji mikrosatelitov zahteva homoplazija, katere posledica je enaka velikost alelov, ki nimajo skupnega prednika. V kolikor pri markerjih upoštevamo samo njihovo velikost (kar je pri mikrosatelitih običajno), je rezultat homoplazije podcenjevanje števila alelov, heterozigotnosti in genetske diverzitete med vrstami (Van Oppen in sod., 2000). Zato je uporaba mikrosatelitskih markerjev nekoliko manj primerna za filogenetske raziskave.

1.4 OPREDELITEV RAZISKOVALNEGA PROBLEMA

Divja češnja je najpomembnejša evropska lesnata vrsta iz družine rožnic. Njen gladek les fine teksture z rdečkasto rumeno do rdečkasto rjavo jedrovino in svetlejšo beljavo je enostaven za obdelavo. Uporablja se v pohištvenem in dekorativnem stavbnem mizarstvu, za opaže, za

izdelovanje glasbil, intarzij idr. (Kotar in Brus, 1999). Barva lesa in odsotnost napak, kot sta zelena obarvanost in trohnoba srca, močno vplivajo na njegovo vrednost (Russell, 2003). Ker povpraševanje po češnjevini presega njeno ponudbo, se iz severne Amerike uvaža ameriška čremsa (*P. serotina* Ehrh.). Pri divji češnji je neprecenljiva tudi njena ekološka vloga. Odpadlo listje bogati tla, kot vrsta je gostitelj mnogih organizmov, ki so nepogrešljivi sestavni del prehranjevalnih spletov. Njeni plodovi predstavljajo pomemben vir hrane za številne ptice, ki so pomembne za vzdrževanje dinamične stabilnosti celotnega ekosistema (Kotar in Brus, 1999).

V Sloveniji je divja češnja avtohtona vrsta, ki se v sestojih pojavlja v posamični primesi ali manjših skupinah. Veljavni Pravilnik o določitvi provenienčnih območij (2003) določa za divjo češnjo celotno Slovenijo kot enotno provenienčno območje. Po Seznamu gozdnih semenskih objektov na dan 1. 1. 2013 (Ur. l. RS, št. 4/2013) imamo v Sloveniji deset semenskih objektov divje češnje, ki so namenjeni pridobivanju GRM. Med njimi jih je devet primernih za uporabo v večnamenskem gozdarstvu. V treh primerih gre za skupine semenjakov in v šestih za semenske sestoje. Med semenskimi sestoji spadajo trije v kategorijo "izbran", ostali v kategorijo "znano poreklo". Objektov kategorij "klasificiran" in "testiran" v Sloveniji nimamo. Kljub izločenim semenskim objektom je zagotavljanje zadostnih količin in ustrezne kakovosti GRM divje češnje v Sloveniji težavno. Razlogi so v slabih obrodih semenskih objektov, kjer so krošnje utesnjene, pridobivanje semena pa nevarno in drago. Zaradi opisanih težav se seme divje češnje pogosto nabira kar v skupinah semenjakov dvomljivega izvora na zaraščajočih se travnikih, odobrenih za pridobivanje kategorije "znano poreklo", kar pa ni optimalno, je dolgoročno nesprejemljivo in tudi zakonsko dovoljeno zgolj kot izjema (Brus in sod., 2010).

Divja češnja je vrsta z velikim gospodarskim in ekološkim potencialom, katere delež bi bilo v naših gozdovih smotrno povečati. Večanje njenega deleža z umetno obnovo pomeni saditev sadik, vzgojenih iz visoko kvalitetnega semena, nabranega v ustreznih semenskih objektih. Celotna poraba sadik pri obnovi gozdov se v zadnjih letih v Sloveniji zmanjšuje (Poročilo..., 2012). Leta 2011 je bilo skupaj posajenih 778.031 sadik, od tega 20 % plemenitih listavcev, med katere uvrščamo tudi divjo češnjo. Po podatkih Zavoda za gozdove so v zadnjih letih v Sloveniji povsem omejili sadnjo velikega jesena zaradi glivične bolezni, ki jo povzroča *Chalara fraxinea*. Izpad sajenja jesena je deloma nadomestila tudi sadnja divje češnje (Poročilo..., 2012).

Divja češnja je vrsta z obveznim navzkrižnim oprševanjem (gametofitna nezdružljivost) in si s pomočjo spolnega razmnoževanja zagotavlja veliko genetsko variabilnost, vendar pa je tudi vrsta, ki se z odganjanjem iz korenin razmnožuje vegetativno, kar vodi k zmanjševanju njene pestrosti. Poznavanje njene genetske variabilnosti je pomemben temelj uspešnega in spreminjačočim se razmeram prilagojenega gojenja in učinkovitega ohranjanja njenega genskega sklada. Kljub dobro razvitim in učinkovitim izoencimskim in DNA tehnikam je divja češnja v evropskem merilu še vedno premalo proučena vrsta. Lastnih raziskav, ki bi

obsegale kakršnokoli proučevanje populacijsko genetskih lastnosti divje češnje v Sloveniji, do sedaj še ni bilo. Povzemanje in upoštevanje tujih virov in raziskav je vsekakor koristno in potrebno, nujno pa je izvesti tudi lastne raziskave s slovenskimi populacijami. Temu v prid govori dejstvo, da je slovensko gospodarjenje z gozdom specifično in zaradi svojega sonaravnega in malopovršinskega pristopa drugačno od gozdarstva v drugih državah Evrope. Če k temu dodamo še rezultate raziskav, ki potrjujejo učinek načina gospodarjenja na populacijske genetske lastnosti vrste (Vaughan in sod., 2007a), ostaja neposredna in nepreverjena implementacija tujih rezultatov vprašljiva.

Kot hitro rastoča vrsta z močno poudarjeno apikalno rastjo, razmeroma kratko življenjsko dobo in visoko vrednim in priljubljenim lesom (slika 4) divja češnja posebno željo po pospeševanju in povečevanju njenega deleža v gozdovih. Poznavanje njenih genetskih lastnosti v naravnih populacijah predstavlja temelj intenzivnejšemu in trajnejšemu gospodarjenju z njo. Slovenija namreč ostaja ena redkih Evropskih držav, v kateri do sedaj ni bil izdelan še noben program žlahtnjenja divje češnje. Takšni, praviloma dolgotrajni programi, katerih končni rezultat so semenske plantaže, so edini način, kako pridobiti lažje dostopen, visokokakovosten, genetsko izboljšan ter rastišču in spremenljivim okoljskim razmeram prilagojen GRM.

2 CILJI NALOGE IN RAZISKOVALNE HIPOTEZE

Genetsko variabilnost divje češnje in primernost ter uporabnost registriranih semenskih objektov divje češnje v Sloveniji bomo preverjali s hipotezami, ki smo jih razdelili v dva sklopa.

Splošne raziskovalne hipoteze, vezane na vse proučevane objekte:

- v skladu z dosedanjimi raziskavami drevesnih vrst pričakujemo veliko znotraj–sestojno in majhno med–sestojno genetsko variabilnost,
- genetske razlike med geografsko bližnjimi sestoji so manjše, kot razlike med bolj oddaljenimi sestoji in
- trenutna izbira semenskih objektov za divjo češnjo ne omogoča redne preskrbe z reprodukcijskim materialom ustrezne kakovosti.

Specifične raziskovalne hipoteze, vezane na raziskovalni objekt Vipavska brda:

- kot posledica vegetativnega razmnoževanja se v sestaju pojavljajo skupine klonov,
- vegetativno razmnoževanje vpliva na genetsko variabilnost in prostorsko–genetsko strukturo sestaja,
- gozdne poti, potoki in jarki preprečujejo vegetativno širjenje divje češnje v sestaju in
- starostna in debelinska sestava ter genetska variabilnost kažejo enake vzorce prostorske strukturiranosti.

3 METODE DELA

3.1 IZBOR RAZISKOVALNIH OBJEKTOV IN VZORČNEGA MATERIALA

Za analize, ob pomoči katerih bi lahko potrdili ali ovrgli raziskovalne hipoteze, smo izbrali štiri raziskovalne ploskve v izbranih, registriranih semenskih objektih, ki hkrati predstavljajo tudi naravne populacije divje češnje v Sloveniji (slika 5).



Slika 5: Lokacije raziskovalnih ploskev divje češnje

Figure 5: Locations of research plots

3.1.1 Opis raziskovalnih ploskev

1. Raziskovalna ploskev: Vipavska brda

ekološka regija:	submediteranska
zemljepisna širina:	45° 46' 25'' N
zemljepisna dolžina:	13° 59' 31'' E
nadmorska višina:	360–370 m n. m.
območna enota ZGS:	Sežana
krajevna enota ZGS:	Sežana
gospodarska enota:	Vrhe
oddelek:	44
prevladujoče združbe:	<i>Ornithogalo pyrenaici–Fagetum sylvaticae</i> (op. združba določena na podlagi razgovora z dr. Igorjem Dakskoblerjem, Lj., 2. april 2013)

nastanek:	naravni nastanek, gospodarjen gozd
tla:	fliš
velikost ploskve:	1,98 ha
tip semenskega objekta:	semenski sestoj
število dreves, zajetih v genetsko analizo:	217

Raziskovalna ploskev se nahaja na dnu doline, ki je na svojem severovzhodnem, jugovzhodnem in jugozahodnem delu omejena s strmejšimi pobočji, na severozahodnem delu pa se dolina zoži na širino manjšega potoka in vlake. Poleg divje češnje se v sestoju v drevesni plasti pojavljajo: graden (*Quercus petraea* (Mattuschka) Liebl.) (op. obravnavani objekt je hkrati tudi semenski sestoj za graden), navadni črni gaber (*Ostrya carpinifolia* Scop.), navadni beli gaber (*Carpinus betulus* L.), gorski javor (*Acer pseudoplatanus* L.), maklen (*Acer campestre* L.), mali jesen (*Fraxinus ornus* L.), mokovec (*Sorbus aria* (L.) Crantz), navadna bukev (*Fagus sylvatica* L.), črni topol (*Populus nigra* L.), drobnica (*Pyrus pyraster* (L.) Burgsd.) in robinija (*Robinia pseudoacacia* L.). V grmovni plasti: navadna leska (*Corylus avellana* L.) in navadni glog (*Crataegus laevigata* (Poir.) DC.).

2. Raziskovalna ploskev: Ilirska Bistrica

ekološka regija:	submediteranska
zemljepisna širina:	45° 35' 20'' N
zemljepisna dolžina:	14° 13' 57'' E
nadmorska višina:	420–470 m n. m.
območna enota ZGS:	Sežana
krajevna enota ZGS:	Ilirska Bistrica
gospodarska enota:	Trnovo
oddelek:	37b
prevladujoče združbe:	<i>Querco-Luzolo -Fagetum</i> (70%), <i>Melamphyro-Quercetum</i>
nastanek:	naravni nastanek, gospodarjen gozd
tla:	rjava tla (fliš)
velikost ploskve:	55 ha
tip semenskega objekta:	semenski sestoj
število dreves, zajetih v genetsko analizo:	32

3. Raziskovalna ploskev: Vrhnik

ekološka regija:	predalpska
zemljepisna širina:	45° 58' 10'' N
zemljepisna dolžina:	14° 16' 39'' E
nadmorska višina:	320–380 m n. m.
območna enota ZGS:	Ljubljana
krajevna enota ZGS:	Vrhnik
gospodarska enota:	Vrhnik
oddelek:	83d, 7a
prevladujoče združbe:	<i>Querco-Fagetum</i>

nastanek:	naravni nastanek, negospodarjen gozd
tla:	karbonatna rjava tla
velikost ploskve:	16 ha
tip semenskega objekta:	skupina semenjakov
število dreves, zajetih v genetsko analizo:	32

4. Raziskovalna ploskev: Zavrč

ekološka regija:	subpanonska
zemljepisna širina:	46° 23' 03'' N
zemljepisna dolžina:	16° 01' 55'' E
nadmorska višina:	220-310 m n. m.
območna enota:	Maribor
krajevna enota:	Ptuj
oddelek:	31a
prevladujoče združbe:	<i>Querco-Fagetum</i>
nastanek:	naravni nastanek, gospodarjen gozd
tla:	pokarbonatna rjava tla
velikost ploskve:	11 ha
tip semenskega objekta:	semenski sestoj (op. predlagan za gozdni genski rezervat)
število dreves, zajetih v genetsko analizo:	31

3.1.2 Nabiranje vzorcev

Nabiranje vzorcev je potekalo poleti leta 2008 ter spomladi in poleti leta 2012 (Vipavska brda). Po teoriji iz populacijske genetike naj bi z vzorcem 30 osebkov iz populacije, ki se naključno opršujejo uspeli zaobjeti okrog 95 % vseh alelov, katerih frekvenca pojavljanja je višja od 5 % (Fraxigen, 2005). Tako smo za potrebe genetske analize na ploskvah Ilirska Bistrica, Vrhnika in Zavrč nabrali vzorce vsaj 30-tih dreves, medsebojno oddaljenih najmanj 30 metrov. Z vsakega drevesa smo odvzeli 1 nepoškodovan list in ga takoj položili na silikagel, kjer je bil hranjen vse do izolacije DNA.

Nabiranje vzorcev na raziskovalni ploskvi Vipavska brda je zaradi geografske lege in omejenosti ploskve potekalo drugače. V vzorec smo vključili vsa drevesa s prsnim premerom nad 5 cm. Za analizo smo nabrali po 1 list na drevo ter ga shranili na silikagel. Na visokih drevesih, pri katerih do listov nismo prišli, smo s pomočjo kovinskega luknjača (Φ 1,5 cm) na korenčniku vzeli vzorec floema. Le-temu smo s skalpelom odstranili tanko notranjo plast (kambijalno plast celic) in jo takoj položili na silikagel, kjer smo jo hranili vse do izolacije DNA.

Vsem drevesom na raziskovalnih ploskvah Ilirska Bistrica, Vrhnika in Zavrč smo s pomočjo naprave Garmin GPSmap 60CSx določili koordinate ter jih s kovinskimi etiketami označili. Ker je natančna prostorska določitev osebkov pri proučevanju prostorsko-genetske strukturiranosti ključnega pomena, smo na ploskvi Vipavska brda, kjer smo v vzorec vključili

vsa drevesa nad 5 cm prsnega premera, s pomočjo naprave Trimble GeoXT določili natančne prostorske koordinate (slika 6) ter jih prav tako nedvoumno označili s kovinskimi etiketami. Pri ugotavljanju površin (površine raziskovalnih ploskev, površine klonov) smo na podlagi zunanjih robnih dreves izrisali poligon ter s pomočjo programske opreme MapSource (Garmin Ltd.) izračunali površino.



Slika 6: Določevanje prostorskih koordinat posameznih divjih češenj v Vipavskih brdih s pomočjo naprave Trimble GeoXT (Jarni, 2011; Vipavska brda)

Figure 6: Mapping the spatial coordinates of wild cherry trees in Vipavska brda using a Trimble GeoXT (Jarni, 2011; Vipavska brda)

3.2 IZOLACIJA IN MANIPULACIJA DNA

3.2.1 Izolacija DNA

Izolacijo DNA smo izvedli s Qiagenovim setom (DNeasy® Plant Mini Kit), kjer smo ca. 20 mg posušenega vzorca (list, kambij) s pomočjo avtomatskih drobilnih mlinov (Retsch MM200 ali Qiagen Tissuelyser LT) zdrobili. Celoten postopek izolacije smo naredili po priloženem protokolu, končno izpiranje DNA pa smo izvedli z $2 \times 50 \mu\text{l}$ elucijskega pufra (ločeno). Tako izolirano DNA smo shranili na 4°C do uporabe v PCR, za daljše časovno obdobje pa na -20°C .

3.2.2 Merjenje koncentracije in kvalitete DNA

Kvaliteto in koncentracijo DNA smo preverili s spektrofotometrom NanoVue (GE Healthcare Life Sciences) z merjenjem absorpcije vzorcev pri 260 in 280 nm. Na podlagi dobljenih vrednosti smo za nadaljnjo analizo izvedli redčitve s čisto vodo, in sicer smo DNA posameznih vzorcev razredčili na koncentracijo ca. $5\text{ng}/\mu\text{l}$. V nekaj primerih, ko je bila izmerjena koncentracija DNA zelo nizka, smo za nadaljnjo analizo uporabili neredčeno DNA.

3.2.3 Verižna reakcija s polimerazo

Genotipizacijo DNA smo izvedli s pomočjo desetih mikrosatelitskih markerjev, vendar ker se je lokus EMPaS10 v preliminarni raziskavi (Jarni in sod., 2012) izkazal za zelo polimorfnega (posamezni aleli so se razlikovali le za eno bazo, zaradi česar je bila določitev pravilnega alela težavna in nezanesljiva), smo se odločili za izključitev omenjenega lokusa iz nadaljnje analize. Nabor ostalih devetih mikrosatelitskih markerjev prikazuje preglednica 1. Izbor le-teh je temeljal na že objavljenih rezultatih tujih raziskav (Vaughan in sod., 2007a, Tančeva–Crmarić in sod., 2011), hkrati pa so proučevani mikrosatelitski lokusi tudi iz seznama 16 predlaganih mikrosatelitov s strani organizacije Evropskega programa za rastlinske genske vire ECPGR^b (Clarke in Tobutt, 2009). 5' konci začetnih oligonukleotidov proizvajalca Life Technologies™ so bili označeni s fluorescentnimi barvili (preglednica 1) za določanje relativne dolžine mikrosatelitov z avtomatskim sekvenatorjem ABI3130XL (Applied Biosystems).

Za pomnoževanje mikrosatelitskih lokusov smo uporabili metodo verižne reakcije s polimerazo, kjer smo izvedli dve multipleksni PCR reakciji (Vaughan in Russell, 2004) in tri simpleks PCR reakcije. V prvo multipleksno reakcijo smo vključili začetna oligonukleotida za štiri lokuse, in sicer EMPa004, EMPa005, EMPaS02 in EMPaS06, medtem ko smo v drugo reakcijo vključili začetna oligonukleotida za lokusa EMPaS12 in EMPaS14. Za ostale tri lokuse EMPa15, UDP98-412 in PceGA34 smo izvedli PCR reakcije z vsakim začetnim

^b European Cooperative Programme for Plant Genetic Resources (ECPGR)

oligonuklotidom posebej, in sicer za lokus EMPa015 po protokolu Clarke in Tobutt (2003) ter po posebnih protokolih za lokusa UDP98-412 in PceGA34 (preglednici 2 in 3).

Preglednica 1: Proučevani mikrosatelitski lokusi, ponavljači motiv, nukleotidno zaporedje začetnih in končnih začetnih oligonukleotidov, uporabljeni fluorescentno barvilo

Table 2: Microsatellite loci, repeat motif, sequence of forward and reverse primers and fluorescent dye

ime lokusa	ponavljači motiv	nukleotidno zaporedje začetnega in končnega začetnega oligonukleotida (5' → 3')	fluorescentno barvilo
EMPaS02 ⁽¹⁾	(TTG) ₇ CTGC(TG) ₁₀ (AG) ₈	CTACTTCCATGATTGCCTCAC AACATCCAGAACATCAACACAC	6-FAM
EMPa004 ⁽²⁾	(GA) ₄ AA(GA) ₄ AA(GA) ₁₅	TACGGTAGGCTCTGCAAGG TTGGCAGGTTCTGTTCACAT	NED
EMPa005 ⁽²⁾	(CT) ₃ CAT(CT) ₁₂ T(AC) ₂₃	TGGGTTGAGCAATATGCAA CACCAATACACATGCACACG	6-FAM
EMPaS06 ⁽¹⁾	(CT) ₁₂	AAGCGGAAAGCAGCAGGTAG TTGCTAGCATAGAAAAGAATTGTAG	HEX
EMPaS12 ⁽¹⁾	(TG) ₁₀ A/GA) ₁₀ AA(GA) ₁₃	TGTGCTAATGCCAAAAATACC ACATGCATTCAACCCACTC	6-FAM
EMPaS14 ⁽¹⁾	(TC) ₁₀ CCAT(TC) ₅ CCAT(TC) ₈	TCCGCCATATCACAAATCAAC TTCCACACAAAAACCAATCC	HEX
EMPa015 ⁽²⁾	(GA) ₃₂	TTTTGGTCAATCTGCTGCTG CTCTCATCTTCCCCCTCCTC	HEX
UDP98-412 ⁽³⁾	(AG) ₂₈	AGGGAAAGTTCTGCTGCAC GCTGAAGACGACGGATGATGA	6-FAM
PceGA34 ⁽⁴⁾	(GA) ₂₅	GAACATGTGGTGTGCTGGTT TCCACTAGGAGGTGCAAATG	NED

⁽¹⁾ Vaughan in Russell (2004); ⁽²⁾ Clarke in Tobutt (2003); ⁽³⁾ Testolin in sod. (2000); ⁽⁴⁾ Downey in Iezzoni (2000)

Preglednica 2: Koncentracije komponent reakcijske mešanice za PCR reakcije posameznih lokusov

Table 2: PCR reaction mix components for different loci

komponenta / lokus	EMPa004, EMPa005, EMPaS02, EMPaS06	EMPaS12, EMPaS14	EMPa015, UDP98- 412, PceGA34
začetni oligonukleotid [µM]	0,22	0,22	0,4
QMMM (µl) ⁽¹⁾	8	8	/
5× PCR pufer	/	/	1×
dNTP [mM]	/	/	0,8
<i>Taq</i> DNA-polimeraza [U]	/	/	0,6
MgCl ₂ [mM]	/	/	2,5
DNA [µl]	2	2	5
volumen reakcije [µl]	16	16	15

⁽¹⁾ Qiagen Multiplex Master Mix

PCR reakcije so potekale v cikličnem termostatu Applied Biosystems 2720. Temperaturni profil za vse lokuse, vključene v multipleksno reakcijo je bil enoten, medtem ko so se profili in trajanje posameznih delov reakcije za ostale tri lokuse, ki so se pomnoževali posamično, razlikovali (preglednica 3).

Preglednica 3: PCR profili – temperatura, trajanje in število ciklov za posamezne lokuse

Table 3: PCR profile – temperature, duration and number of cycles for different loci

lokus	PCR profil
EMPa004, EMPa005, EMPaS02, EMPaS06, EMPaS12, EMPaS14	15' 95° 10 ciklov: 30" 94°, 90" 60° -1°C/cikel, 60" 72° 25 ciklov: 30" 94°, 90" 48°, 60" 72° 30' 60° 15' 4° ∞ 15°
EMPa015	2' 94° 9 ciklov: 30" 94°, 45" 60°, 60" 72° 25 ciklov: 30" 94°, 45" 55°, 60" 72° 5' 72° 15' 4° ∞ 15°
UDP98-412	2' 94° 35 ciklov 30" 94°, 45" 60°, 60" 72° 5' 72° 15' 4° ∞ 15°
PceGA34	2' 94° 35 ciklov 30" 94°, 45" 55°, 60" 72° 5' 72° 15' 4° ∞ 15°

3.2.4 Analiza mikrosatelitov na avtomatskem sekvenatorju

Mikrosatelitske fragmente smo ločili in določili njihove relativne dolžine s pomočjo kapilarne elektroforeze na avtomatskem sekvenatorju ABI3130XL (Applied Biosystems). Različno fluorescentno označeni 5' konci začetnega oligonukleotida so nam po opravljenih prilagoditvah relativnih koncentracij posameznih PCR produktov omogočili razpoznavanje štirih (EMPa004, EMPa005, EMPaS02 in EMPaS06) oziroma dveh (EMPaS12 in EMPaS14) lokusov znotraj multipleksnih PCR produktov, kot tudi »post PCR« mešanje treh samostojnih PCR produktov istega osebka (EMPa15, UDP98-412 in PceGA34). V vseh primerih je bil za notranji velikostni standard uporabljen GeneScan™ 500 ROX (Applied Biosystems), ki ima 16 fragmentov znanih dolžin v območju od 35 do 500 bp. Kljub temu, da protokoli za uporabljeni fluorescentni barvila posameznih začetnih oligonukleotidov predvidevajo uporabo matrike DS-30, smo na sekvenatorju delali po kompatibilni matriki DS-32, kar pa ni vplivalo na rezultate. Rezultate smo dobili v obliki binarnih kromatogramskih datotek tipa FSA.

3.2.5 Določanje velikosti alelov

Pregledovanje rezultatov, določanje relativne velikosti fluorescentnih signalov in dolžine alelov smo opravili s pomočjo programske opreme Peak Scanner™ 1.0 (Applied Biosystems). S pomočjo notranjega standarda (GeneScan™ 500 ROX) smo alegom določili dolžine na dve decimalki natančno. Velja omeniti, da smo predhodno, pred samim 'merjenjem' dolžin, pregledali vsak lokus na vseh vzorcih ter poskušali razbrati značilnosti krivulje elektroferograma. Takšno poznavanje značilnosti je namreč pomembno pri ohranjanju konsistence določevanja alelov. Posebno pozornost smo namenili lokusom, kjer se je kazal vzorec multiplih vrhov oz. senčnih lis (ang. stutter bands), do katerega prihaja zaradi zdrsa polimeraze znotraj PCR reakcije. Pozornost pa je bila namenjena tudi lokusu PceGA34, kjer se je pokazala sposobnost polimeraze za dodajanje ene baze na konec pomnoženega fragmenta (Hu, 1993). Na koncu smo vse dobljene rezultate prenesli v Excel tabelo, kjer smo jih sortirali po velikosti ter jim dodelili relativno velikost z zaokroževanjem decimalnih vrednosti na 1 bp natančno. Pri tem smo pazili, da je bil velikostni razred 1 bp. V nekaj primerih je bilo zaradi pomanjkanja diskretnega prehoda med dolžinama dveh alelov potrebno postopek pomnoževanja (PCR) in določanje velikosti alelov ponoviti.

3.3 ANALIZA PODATKOV

V štirih naravnih sestojih smo s pomočjo devetih mikrosatelitskih lokusov skupno analizirali 314 osebkov divje češnje. Ker smo z genetsko analizo potrdili obstoj klonov, smo za vsako klonsko skupino izračunali prostorske koordinate, ki so predstavljale srednjo točko klonske skupine. Tako izračunane vrednosti so predstavljale hipotetično generativno nastalo matično drevo (Vaughan in sod., 2007a), katerega smo upoštevali povsod, kjer smo v analize vključevali le po eno drevo / genotip. Pri proučevanju učinkov vegetativnega razmnoževanja smo v analize vključili vsa drevesa iz klonov.

3.3.1 Vezavno neravovesje

Vezavno neravovesje je nenaključno združevanje alelov na dveh ali več lokusih, ki so lahko na istem ali različnem kromosomu. Do neravovesja lahko pride zaradi interakcij med aleli, ki so posledica vezave genov, stopnje rekombinacije, selekcije, mutacij, nenaključnega zdrsa, nenaključnega parjenja in populacijske strukture. Ničelno hipotezo (H_0) da je genotip na enem lokusu neodvisen od genotipov na drugih lokusih, smo testirali za vse pare lokusov v vsakem sestoju s programom Genepop 4.0 (Rousset, 2008), kjer smo izvedli eksaktni G -test. Parametri algoritma markovske verige so bili dememorizacija (20.000 ponovitev), število paketov (200) in število ponovitev na paket (10.000). Zaradi multiplih simultanih primerjav smo izvedli Bonferronijev popravek kritične vrednosti P (Rice, 1989).

3.3.2 Hardy–Weinbergovo ravnovesje

Hardy–Weinbergovo načelo, ki govori o povezavi med frekvencami alelov in genotipov, je osnova populacijske genetike. S programom Genepop 4.0 smo testirali, ali so frekvence genotipov na vsakem lokusu v sestoju v Hardy–Weinbergovem ravnotežju. Za to smo uporabili različne teste; i) verjetnosti test ii) U–test za testiranje alternativnih hipotez o pomanjkanju ali presežku heterozigotov. U–test ima v primerjavi z verjetnostnim testom nekoliko večjo moč (Raymond in Rousset, 1995). Za globalne ocene vseh lokusov smo uporabili verzijo U–testa za multiple vzorce, ki zahtevajo statistično neodvisnost med lokusi. Zavrnitev ničelne hipoteze (H_0), da je genotip rezultat naključnega združevanja gamet, je lahko posledica različnih vzrokov. Povečano število heterozigotov lahko pomeni prisotnost naddominance (prednosti heterozigotov) ali pa pojav alogamije. Pomanjkanje heterozigotov je lahko posledica parjenja med sorodniki (ang. inbreeding), populacijskih podstruktur (Wahlundov učinek), vezavnega neravnovesja (vezave lokusov), selekcije proti heterozigotom ali dejavnikov, kot so senčne lise, ničelni aleli in dominanca kratkih alelov (Westergren, 2010).

3.3.3 Ničelni aleli

S pomočjo programa Micro-Checker (Van Oosterhout in sod., 2004) smo preverili najbolj pogoste vzroke napak, ki nastajajo pri identifikaciji in izolaciji v procesu verižne reakcije s polimerazo. Pomanjkanje heterozigotov na mikrosatelitskih lokusih je velikokrat posledica prisotnosti ničelnih alelov, to so aleli, ki se v PCR ne pomnožijo. Do tega najverjetnejše prihaja zaradi mutacije (delecija, insercija) na mestu vezave začetnega oligonukleotida (Callen in sod., 1993; Jones in sod., 1998). Do ničelnih alelov lahko pride tudi zaradi dominance oz. preferenčnega pomnoževanja kratkih alelov kar posledično vodi k izpadu dolgih alelov (Wattier in sod., 1998). Napačna identifikacija ničelnih alelov lahko privede do nepravilne ocene frekvence alelov in s tem do podcenjene stopnje heterozigotnosti.

3.3.4 Verjetnost identitete P_{ID}

Verjetnost identitete (P_{ID}) je ocenjena srednja verjetnost, da imata dva naključno izbrana posameznika identičen genotip (Peakall in Smouse, 2012). Ocena P_{ID} predvideva, da se osebki v populaciji križajo naključno in da so medsebojno nesorodni. Izračunamo jo po formuli:

$$P_{ID} = 2(\sum p_i^2)^2 - \sum p_i^4 \quad \dots (1)$$

kjer je p_i frekvenca alela i .

Modificirana (bolj konservativna) ocena verjetnosti identitete $P_{ID,sibs}$ je primerna, kadar vzorci proučevanja vsebujejo tudi medsebojno sorodne osebke (Taberlet in Luikart, 1999; Waits in sod., 2001):

$$P_{ID,sibs} = 0.25 + (0.5 \sum p_i^2) + [0.5(\sum p_i^2)^2] - (0.25 \sum p_i^4) \quad \dots (2)$$

P_{ID} in P_{IDsibs} izračunamo za vsak lokus posebej, medtem ko multilokusne genotipe izračunamo kot produkt posameznih lokusov. Vrednosti smo izračunali s pomočjo programa GenAlEx (Pekall in Smouse, 2006, 2012).

3.3.5 Analiza genetske variabilnosti

Na podlagi alelne sestave smo s številnimi kazalniki (preglednica 4) ocenili znotraj- in medsestojno genetsko variabilnost. Za vizualizacijo vzorcev genetskih razmerij med posameznimi sestoji smo s pomočjo programske opreme GenAlEx izvedli analizo glavnih koordinat (PCoA, ang. Principal Coordinates Analysis). Na podlagi multivariatnih podatkov nam metoda omogoča vpogled v osnovne strukturne vzorce brez dejanskega spremnjanja samih podatkov. Dobljene rezultate smo interpretirali tudi s pomočjo ocene števila razmnoževalno uspešnih migrantov na generacijo, kar smo izračunali po metodi privatnih alelov (Barton in Slatkin, 1986) s pomočjo programa Genepop 4.0.

Preglednica 4: Kazalniki genetske variabilnosti in programska oprema za njihov izračun

Table 4: Genetic variability indices and programme packages used

kazalnik	okrajšava	angleško poimenovanje	program
število alelov	A	No. of alleles	SPAGeDi ^A
število alelov, neodvisno od velikosti vzorca	A_R	Allelic richness	SPAGeDi ^A
razpon alelov	RA	Range of allele sizes	GenAlEx ^B
število alelov s frekvenco enako ali večjo od 0,05	$A_{\geq 0,05}$	No. of alleles with frequency higher than 0,05	GenAlEx ^B
število lokalno pogostih alelov v 25 % ali manj populacijah	$A_{L \leq 0,25}$	No. of locally common alleles found in 25 % or fewer populations	GenAlEx ^B
število lokalno pogostih alelov v 50 % ali manj populacijah	$A_{L \leq 0,50}$	No. of locally common alleles found in 50 % or fewer populations	GenAlEx ^B
število efektivnih alelov	A_E	No. of effective alleles	GenAlEx ^B
število privatnih alelov	A_{priv}	No. of private alleles	
opažena heterozigotnost	H_O	Observed heterozygosity	Arlequin ^C
genska diverziteta (pričakovana heterozigotnost)	H_E	Gene diversity	Arlequin ^C
skupna genska diverziteta	H_T	Overall gene diversity	FSTAT ^D
Wrightov koeficient inbridinga	F_{IS} in F_{ST}	Wright's inbreeding coefficient	Arlequin ^C
standardiziran kazalnik genetske diferenciacije	G'_{ST}	Hedrick's standardized G_{ST}	GenAlEx ^B

^A Hardy in Vekemans (2002), ^B Pekall in Smouse (2006, 2012), ^C Excoffier in sod. (2005), ^D Goudet (1995)

3.3.6 Analiza prostorsko-genetske strukture

Ker smo z genetsko analizo v sestoju Vipavska brda potrdili obstoj klonov, smo za vsako klonsko skupino izračunali povprečni prsni premer in prostorske koordinate, ki so predstavljale srednjo točko klomske skupine. Tako izračunane vrednosti so predstavljalne

hipotetično generativno nastalo matično drevo, katerega smo upoštevali pri analizah razširjanja genov in povsod tam, kjer smo v analize vključevali le po eno drevo / genotip.

S pomočjo kazalnikov, kot sta izoliranost z razdaljo in prostorska avtokorelacija, smo v sestoju Vipavska brda podrobneje proučili odnose med genetskimi in geografskimi razdaljami. Večino prostorskih analiz smo izvedli dvakrat, in sicer i) v analizo vključena vsa drevesa iz klonskih skupin ii) v analizo vključeno eno drevo / genotip. Slednje omogoča nepristransko oceno prostorsko–genetske strukture, ki je posledica izolacije z razdaljo.

Prostorsko–genetsko strukturo smo ocenili s koeficientom sorodnosti^c F_{ij} (Loiselle in sod., 1995), ki se ga izračuna kot:

$$F_{ij} = \frac{\sum_l \sum_k (p_i - \bar{p}_k)(p_j - \bar{p}_k)}{\sum_l \sum_k (\bar{p}_k(1 - \bar{p}_k) + \frac{1}{(2n-1)})} \quad \dots (3)$$

kjer je \bar{p}_k povprečna frekvence alela k na lokusu l v populaciji z n osebki in kjer sta p_i in p_j frekvenci alela k v osebkih i in j (Hardy in Vekemans, 2002). Proizvod formule je koeficient sorodnosti, ki je znotraj referenčne populacije relativen. Stopnjo povezanosti med matriko parnih primerjav koeficientov sorodnosti in matriko geografskih razdalj smo prikazali na logaritemski skali, saj analiza SGS temelji na teoretičnem modelu izolacije z razdaljo, ki predvideva, da se v dvorazsežnem prostoru koeficient sorodnosti med individuumi spreminja približno linearно z logaritmom razdalje (Hardy in Vekemans, 2002; Fenster in sod., 2003). Značilnost koeficientov sorodnosti F_{ij} smo testirali s permutacijskim testom z 10.000 ponovitvami, kar je ekvivalentno Mantel testu (Mantel, 1967). Koeficiente sorodnosti F_{ij} smo za grafično predstavitev izračunali tudi za pare, katerih geografska oddaljenost je pripadala razredom oddaljenosti (v metrih): 0–40, 40–80, 80–120, 120–160, 160–200, 200–240, 240–280 in 280–320.

Obseg razširjanja genov smo ocenili z velikostjo soseske (N_b) s postopkom navadne iteracije kot:

$$N_b = 4\pi D \sigma^2 \quad \dots (4)$$

kjer (D) predstavlja gostoto populacije in kjer je σ^2 enaka varianci osne razdalje razširjanja genov. N_b je uporaben sintetični kazalec ravnotežja med lokalnim genetski zdrsom in razširjanjem genov v kontinuirani populaciji, ki predvideva prostorsko–genetsko strukturo v intervalu med in 3σ (Vekemans in Hardy, 2004). Na velikost soseske lahko gledamo tudi kot na krožno površino, znotraj katerega ostaja parjenje v sorodstvu neznačilno. Velikost soseske smo testirali za različne efektivne gostote (D_e) in sicer smo predpostavili, da je D_e enak $D/2$, $D/5$ in $D/10$.

^c Koeficient sorodnosti izhaja iz angleške besede 'kinship coefficient', ki je pogosto definiran kot verjetnost skupnega porekla proučevanih genov

Zaradi možnosti primerjave z drugimi vrstami sta Vekemans in Hardy (2004) definirala statistiko ' Sp ', kjer je:

$$Sp = -b_F/(1 - F_1) \quad \dots (5)$$

V našem primeru je F_1 ocena koeficiente sorodnosti F_{ij} med drevesi znotraj prvega razreda oddaljenosti. ' Sp ' statistika pa ne omogoča samo boljše primerjave med različnimi vrstami, temveč tudi med posameznimi populacijami znotraj iste vrste, medtem ko je sam koeficient sorodnosti odvisen od uporabljenega načina vzorčenja.

Velikost učinka vegetativnega razmnoževanja na prostorsko-genetsko strukturo smo izračunali kot:

$$SGS \text{ po \% veg} = 100 - 100 \times Sp_{ind} / Sp_{vsi} \quad \dots (6)$$

Sp_{ind} je statistika Sp izračunana brez osebkov vegetativnega nastanka in Sp_{vsi} izračunana Sp statistika z vsemi drevesi.

Prostorsko–genetska struktura v odvisnosti od debeline dreves

Z namenom iskanja povezav med genetsko in debelinsko strukturo smo na raziskovalni ploskvi Vipavska brda vsem drevesom divje češnje nad 5 cm prsnega premera s π -trakom izmerili prsni premer. Šestim najdebelejšim drevesom v sedmih najštevilčnejjih klonskih skupinah (izbor teh dreves je bil narejen po že opravljeni genetski analizi) smo s pomočjo prirastnega svedra odvzeli izvrtke, na podlagi katerih smo ugotavljali starost dreves (slika 7). Prirastne izvrtke smo pred analizo pripravili po uveljavljeni dendroekološki metodologiji (Stokes in Smiley, 1968). Izvrtke smo posušili, prilepili na lesene nosilce in zbrusili z brusnim papirjem s postopnim prehodom od grobe do najfinejše granulacije. Štetje branik smo izvedli s stereoskopskim mikroskopom Nikon SMZ80 pod 10–kratno povečavo. V primeru, ko smo z izvrtkom zgrešili stržen drevesa, smo število letnic do stržena ocenili na podlagi oblike krivin vidnih letnic in povprečne širine zadnjih treh vidnih branik (predpostavljajoč krožno rast). Na mestu izvrtka smo z metrom izmerili obseg drevesa ter višino od tal do samega mesta vrtanja. Višino vrtanja, ki je v večini primerov znašala 60 cm (izjemoma do 120 cm) smo upoštevali tako, da smo ugotovljeni starosti prišteli od 1 do 3 leta.

Nenaključna debelinska razporeditev dreves v populaciji v povezavi s fenologijo cvetenja (večja drevesa močneje cvetijo in semenijo) lahko vpliva na prostorsko–genetsko strukturo sestoja. Z namenom proučitve povezave med debelino dreves in SGS smo v sestoju Vipavska brda drevesa generativnega nastanka razdelili v dve, po številu približno enaki skupini. Prva skupina je vsebovala drevesa s prsnim premerom manjšim od 24 cm in druga s premerom večjim od 24 cm. Koeficiente sorodnosti F_{ij} smo prikazali na logaritemski skali geografskih razdalj, 95% interval zaupanja smo izračunali s pomočjo permutacijskega testa z 10.000 ponovitvami. Analize smo izvedli s programom SPAGeDi (Hardy in Vekemans, 2002).

Povezave med debelinskimi in geografskimi razdaljami med drevesi v sestoju Vipavska brda smo proučevali s pomočjo avtokorelacijskih testov s programom GenAIEx (Peakall in Smouse, 2006, 2012). Testiranje avtokorelacijskega koeficienta ' r' in postavitev 95% intervala zaupanja smo izvedli z 10.000 naključnimi permutacijami. Interval zaupanja okoli vrednosti ' r' pa smo izračunali s pomočjo zankanja (ang. bootstrap) z 10.000 ponovitvami.



Slika 7: Starost nekaterih najdebelejših dreves smo ugotavljali s pomočjo izvrtnkov (Jarni, 2012; Vipavska brda)
Figure 7: Ages of some of the thickest trees were determined using tree cores (Jarni, 2012; Vipavska brda)

4 REZULTATI

4.1 VEZAVNO NERAVNOVESJE

V sestojih Ilirska Bistrica, Vrhnika in Zavrč z eksaktnim testom vezavnega neravovesja in po uporabi sekvenčnega Bonferronijevega popravka nismo zavrnili nobene ničelne hipoteze o neodvisnosti med genotipi dveh lokusov (priloga A). Smo pa ničelno hipotezo o neodvisnosti lokusov zavrnili v treh kombinacijah lokusov v sestoju Vipavska brda (EMPa005, EMPaS12, EMPaS02, EMPaS06). Na podlagi opravljenih analiz lahko trdimo, da so analizirani lokusi znotraj sestojev medsebojno neodvisni, manjša izjema je le sestoj Vipavska brda.

4.2 HARDY–WEINBERGOVO RAVNOTEŽJE

Za večino lokusov v posameznih sestojih značilnih odstopanj od Hardy–Weinbergovega ravnotežja nismo potrdili (preglednici 5 in 6). Odstopanja, ki so posledica pomanjkanja heterozigotov, smo potrdili le za lokusa EMPaS12 in EMPaS14 v sestoju Vrhnika in za lokus EMPaS14 v sestoju Zavrč.

Preglednica 5: Rezultati testa odklonov od Hardy–Weinbergovega ravnotežja zaradi pomanjkanja heterozigotov. Podane so verjetnosti (vrednosti P) in stopnja značilnosti za vsak lokus v vsakem sestaju ter rezultati globalnega testa, ko je **H_1 = pomanjkanje heterozigotov**. Stopnje značilnosti so z uporabo sekvenčnega Bonferronijevega popravka prilagojene za multiple primerjave (Rice, 1989) (* $0,01 < P < 0,05$; ** $0,001 < P < 0,01$; *** $P < 0,001$)

Table 5: Deviations from Hardy–Weinberg equilibrium. P values and significance levels are given for each locus in each stand and globally. **H_1 = Heterozygote deficiency.** U score test was used. Significance levels are adjusted using sequential Bonferroni according to Rice (1989) (* $0,01 < P < 0,05$; ** $0,001 < P < 0,01$; *** $P < 0,001$)

sestoj→ lokus↓	Vipavska brda	Ilirska Bistrica	Vrhnika	Zavrč	globalno
EMPaS02	0,9754	0,4871	0,4252	0,1058	0,6435
EMPa004	0,0333	0,6185	0,3216	0,7067	0,1190
EMPa005	0,0753	0,4748	0,9695	0,9979	0,6581
EMPaS06	0,8732	0,4899	0,2978	0,5499	0,7183
EMPaS12	0,9220	0,7806	0,0015**	0,9454	0,5832
EMPaS14	0,9756	0,0162	0,0001***	0,0003**	0,0036*
EMPa015	0,8996	0,4732	0,2969	0,3156	0,5852
UDP98-412	0,5539	0,1671	0,0889	0,9933	0,4483
PceGA34	0,9367	0,8488	0,4853	0,7234	0,9569
globalno ^A	0,9198	0,6502	0,0703	0,9439	

^A globalni test brez lokusa EMPaS14

Globalnih odstopanj od Hardy–Weinbergovega ravnotežja nismo potrdili v nobenem od analiziranih sestojev (preglednici 5 in 6). Globalno pomanjkanje heterozigotov smo potrdili le za lokus EMPaS14 (preglednica 5).

Preglednica 6: Rezultati testa odklonov od Hardy–Weinbergovega ravnotežja zaradi presežka heterozigotov. Podane so verjetnosti (vrednosti P) in stopnja značilnosti za vsak lokus v vsakem sestoju ter rezultati globalnega testa, ko je **H1 = presežek heterozigotov**. Stopnje značilnosti so z uporabo sekvenčnega Bonferronijevega popravka prilagojene za multiple primerjave (Rice, 1989). (* $0,01 < P < 0,05$; ** $0,001 < P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

Table 6: Deviations from Hardy–Weinberg equilibrium. P values and significance levels are given for each locus in each stand and globally. **H1 = Heterozygote excess.** U score test was used. Significance levels are adjusted using sequential Bonferroni according to Rice (1989). (* $0,01 < P < 0,05$; ** $0,001 < P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

sestoj→ lokus↓	Vipavska brda	Ilirska Bistrica	Vrhnička	Zavrč	globalno
EMPaS02	0,0275	0,5316	0,6013	0,9052	0,3584
EMPa004	0,9627	0,4733	0,7389	0,2998	0,8799
EMPa005	0,9252	0,5327	0,0318	0,0073	0,3390
EMPaS06	0,1321	0,5202	0,7133	0,4593	0,2997
EMPaS12	0,0831	0,2430	0,9989	0,0580	0,4208
EMPaS14	0,0899	0,9887	1,0000	0,9997	0,9967
EMPa015	0,1247	0,6016	0,7231	0,7029	0,4053
UDP98-412	0,4389	0,8327	0,9132	0,0136	0,5488
PceGA34	0,0652	0,1982	0,5175	0,2842	0,0412
globalno ^A	0,0857	0,3467	0,9303	0,0518	

^A globalni test brez lokusa EMPaS14

4.3 NIČELNI ALELI

Analiza ničelnih alelov je pokazala na možno prisotnost le-teh na dveh lokusih, in sicer na lokusu EMPaS02 v sestaju Vipavska brda in na lokusu EMPaS14 v sestojih Vrhnička in Zavrč. Na možno prisotnost ničelnih alelov kaže presežek homozigotov za večino alelnih razredov, kar kaže tudi izračunana verjetnost za vse razrede skupaj ($p < 0,05$). Glede na rezultate (značilno pomanjkanje heterozigotov (preglednica 5), majhna variabilnost (preglednica 8)) in dejstvo, da lahko prisotnost ničelnih alelov bistveno vpliva na izsledke raziskave, smo se odločili za izločitev lokusa EMPaS14 iz nadaljnjih populacijsko genetskih analiz (op. lokus EMPaS14 smo upoštevali le na ravni proučevanja lokusov, ne pa tudi na ravni sestojev).

4.4 VERJETNOST IDENTITETE P_{ID}

V vzorcu 312 analiziranih dreves smo odkrili 163 različnih multilokusnih genotipov. V sestojih Ilirska Bistrica in Zavrč imajo vsa drevesa unikatne genotipe (eno drevo / en genotip). V sestaju Vrhnička smo enak genotip potrdili pri dveh drevesih. V sestaju Vipavska brda pa smo odkrili kar 177 dreves (81,6 % vseh analiziranih dreves v sestaju), ki imajo identičen multilokusni genotip kot vsaj še en osebek v istem sestaju. Velikost skupin (število dreves) z enakim genotipom se v sestaju Vipavska brda giblje med 2 in 21 drevesi (povprečno 6 dreves na genotip, priloga B).

Na podlagi analize osmih mikrosatelitskih markerjev se verjetnost, da bi imeli dve naključno izbrani drevesi v populaciji enak genotip, giblje med 8.80×10^{-9} v Zavrču in 6.80×10^{-8} v Vipavskih brdih (preglednica 7). V kolikor upoštevamo tudi sorodstvena razmerja med naključno izbranimi osebki (konservativnejši izračun), je verjetnost sicer večja, giblje se med 9.80×10^{-4} v sestoju Vrhnika in 1.10×10^{-3} v Ilirske Bistrice, vendar še vedno dovolj majhna, da omogočajo zelo zanesljiva sklepanja. Razlika med izračunanimi verjetnostmi je največja v sestoju Zavrč in najmanjša v Vipavskih brdih.

Preglednica 7: Verjetnost identitete P_{ID} (Peakall in Smouse, 2012) in P_{IDsibs} (Taberlet in Luikart, 1999, Waits in sod., 2001) po sestojih

Table 7: Probability of identity P_{ID} (Peakall in Smouse, 2012) and P_{IDsibs} (Taberlet in Luikart, 1999, Waits et al., 2001) per stand

parameter → sestoj↓	P_{ID}	P_{IDsibs}
Vipavska brda	$6,80 \times 10^{-8}$	$1,20 \times 10^{-3}$
Ilirska Bistrica	$5,10 \times 10^{-8}$	$1,10 \times 10^{-3}$
Vrhnika	$3,30 \times 10^{-8}$	$9,80 \times 10^{-4}$
Zavrč	$8,80 \times 10^{-9}$	$7,00 \times 10^{-4}$



Slika 8: Drevesa istega klena so si lahko fenotipsko zelo podobna (Jarni, 2008; Kolovrat)

Figure 8: Trees of the same clone can be phenotypically very similar (Jarni, 2008; Kolovrat)

Ob velikem številu dreves z enakim multilokusnim genotipom na eni strani ter na drugi strani majhni verjetnosti, da bi imeli dve naključni izbrani drevesi v sestoju enak genotip (preglednica 7) in ob dejstvu, da so si vsa drevesa z identičnim genotipom tudi prostorsko zelo blizu (slika 20, priloga B), lahko z veliko gotovostjo trdimo, da imamo v sestojih Vipavska brda in Vrhnika drevesa, ki so vegetativnega izvora.

Kljub temu, da na genetsko strukturo populacij divje češnje vplivata tako generativno kot vegetativno razmnoževanje, smo se pri sestojnih primerjavah odločili, da v statistične analize vključimo samo po eno drevo oziroma genotip.

4.5 VARIABILNOST MIKROSATELITSKIH LOKUSOV

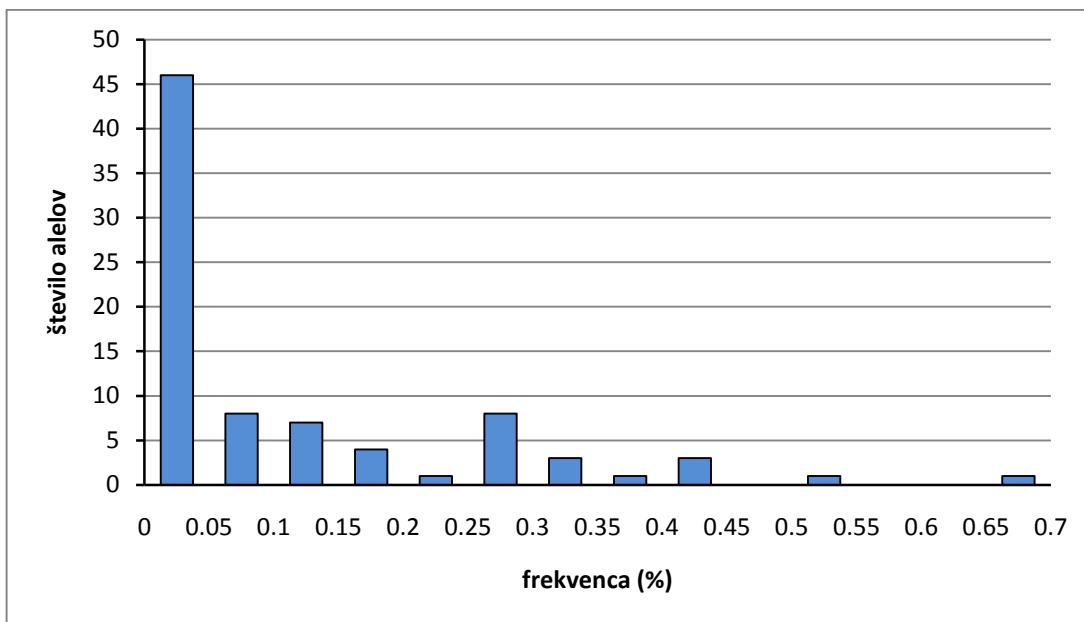
Znotraj 312 dreves divje češnje smo na 9 mikrosatelitskih lokusih skupno odkrili 83 različnih alelov (preglednica 8). Največ različnih alelov smo našli na lokusih EMPa015 in PceGA34, na vsakem po 16, medtem ko smo na lokusu EMPaS14 identificirali le 3 alele.

Preglednica 8: Dolžine (in v oklepajih frekvence) alelov devetih mikrosatelitskih lokusov, najdenih v štirih sestojih divje češnje

Table 8: Allele lengths (bp) and their frequency in brackets for nine microsatellite loci found in four seed stands of wild cherry

lokus	dolžine alelov (bp)
EMPaS02	132 (.002), 135 (.048), 139 (.022), 141 (.255), 144 (.042), 146 (.438), 148 (.194)
EMPa004	182 (.013), 184 (.277), 188 (.002), 190 (.216), 192 (.341), 194 (.149), 196 (.002)
EMPa005	233 (.005), 241 (.035), 243 (.006), 245 (.003), 247 (.135), 248 (.011), 249 (.284), 250 (.072), 256 (.003), 258 (.441), 260 (.005)
EMPaS06	204 (.122), 206 (.359), 208 (.130), 210 (.011), 211 (.002), 215 (.010), 216 (.003), 221 (.026), 224 (.311), 226 (.027)
EMPaS12	123 (.018), 136 (.200), 138 (.439), 140 (.002), 145 (.300), 147 (.042)
EMPaS14	198 (.681), 200 (.066), 213 (.253)
EMPa015	215 (.069), 219 (.006), 221 (.013), 223 (.147), 225 (.519), 227 (.032), 229 (.002), 244 (.088), 248 (.002), 251 (.005), 252 (.002), 254 (.069), 255 (.002), 256 (.027), 257 (.016), 259 (.002)
UDP98-412	111 (.119), 113 (.003), 117 (.264), 119 (.293), 121 (.013), 123 (.305), 125 (.003)
PceGA34	128 (.013), 132 (.173), 134 (.160), 136 (.002), 138 (.002), 140 (.266), 142 (.007), 149 (.002), 151 (.123), 153 (.056), 155 (.010), 159 (.053), 161 (.054), 163 (.015), 165 (.020), 167 (.046)

Na sliki 9 je prikazan histogram pogostosti alelov na analiziranih mikrosatelitskih lokusih. Od skupno 83 alelov se jih je 46 pojavljalo s frekvenco, nižjo kot 5 %. Najpogosteji alel je bil 198 bp na lokusu EMPaS14 (68 %), sledijo mu alel 225 bp EMPa015 (52 %), alel 258 bp EMPa005 (44 %) itd.



Slika 9: Število alelov na 9 mikrosatelitskih lokusih glede na frekvenco pojavljanja v 163 drevesih divje češnje
Figure 9: Number of alleles at 9 microsatellite loci in relation to their frequency as analysed in 163 wild cherry trees

Od devetih analiziranih mikrosatelitskih lokusov sta se le dva (EMPa004 in UDP-412) popolnoma prilegala modelu stopničastih mutacij (ang. stepwise mutation). Ker smo na drugih lokusih zabeležili znaten delež alelov, ki so se razlikovali za enoto, različno od enote tandemske ponovitve (npr. enota tandemske ponovitve je 2 bp, posamezni aleli pa se razlikujejo za 1 bp ali 3 bp), smo se odločili, da iz analiz izpustimo statistiko, ki temelji na modelu stopničastih mutacij kot je npr. R_{ST} (Slatkin, 1995).

Povprečno število pričakovanih alelov na lokus v sestojih, tj. efektivno število alelov (A_e) znaša med 2,284 za najmanj variabilen lokus EMPaS14 in 5,359 za najbolj variabilnega PceGA34. To število alelov (A_e), ki se nanaša na idealno Wright-Fisherjevo populacijo, je v primerjavi z dejanskim stanjem v sestojih (primerjava med A in A_e) v razmerju med 1,3:1 pri lokusu EMPaS14 in 3,85:1 pri lokusu EMPa015. Skupna genetska diverziteta (H_T) je pri posameznih lokusih podobna, izjema je lokus EMPaS14, ki kaže za okrog 30 % manj variabilnosti od drugih lokusov (preglednica 9). Z največjo diverziteteto rahlo izstopa lokus PceGA34 ($H_T = 0.832$). Indeks fiksacije (F_{ST}), ki znaša med 0,017 in 0,098, kaže zmerno variabilnost, medtem ko je indeks inbridinge (F_{IS}) variabilnejši in zavzema vrednosti med –0,122 in 0,179.

Preglednica 9: Raznolikost jedrnih mikrosatelitskih lokusov. (N) število dreves; (RA) razpon velikosti alelov; (A) število vseh alelov; (A_e) efektivno število alelov; (H_T) skupna genska diverziteta; (F_{IS}) Wrightov koeficient inbridinga; (F_{ST}) fiksacijski indeks. Stopnje značilnosti so z uporabo sekvenčnega Bonferronijevega popravka prilagojene za multiple primerjave (Rice, 1989) (n.s. $P > 0,05$; * $0,01 < P < 0,05$; ** $0,001 < P < 0,01$; *** $P < 0,001$)

Table: 9 Diversity of nuclear microsatellites loci. (N) number of trees; (RA) size range; (A) number of alleles; (A_e) effective number of alleles; (H_T) total gene diversity; (F_{IS}) Wright's inbreeding coefficient; (F_{ST}) fixation index. Significance levels are adjusted using sequential Bonferroni according to Rice (1989) (* $0,01 < P < 0,05$; ** $0,001 < P < 0,01$; *** $P < 0,001$)

parameter → lokus↓	N^A	RA (bp)	A	A_e	H_T	F_{IS}	F_{ST}
EMPaS02	163	132–148	7	3,548	0,745	-0,001 n.s.	0,035 **
EMPa004	163	182–196	7	3,068	0,712	0,077 n.s.	0,098 ***
EMPa005	163	233–260	11	3,159	0,697	-0,112 n.s.	0,023*
EMPaS06	163	204–226	10	3,896	0,763	-0,045 n.s.	0,023*
EMPaS12	163	123–147	6	3,216	0,724	-0,081 n.s.	0,063 ***
EMPaS14	163	198–213	3	2,284	0,577	0,179 **	0,094 ***
EMPa015	163	215–259	16	4,155	0,767	0,005 n.s.	0,042 ***
UDP98–412	162	111–125	7	3,701	0,751	-0,011 n.s.	0,025*
PceGA34	156	128–167	16	5,359	0,832	-0,061 n.s.	0,017*
multilokusno ^B				0,749	-0,029		0,040

^A eno drevo na genotip; ^B brez lokusa EMPaS14

4.6 GENETSKA VARIABILNOST ZNOTRAJ SESTOJEV

Opažena heterozigotnost (H_O) je v sestojih visoka in znaša v povprečju 0,742 (preglednica 10). Pri posameznih lokusih se giblje med 0,290 (EMPaS14, Zavrč) in 0,922 (PceGA34, Vipavska brda) (priloga C). Pričakovana heterozigotnost na lokusih (H_E) je v intervalu med 0,357 (EMPaS14, Vipavska brda) in 0,854 (EMPa015, Zavrč). Genetska diverziteta (H_E) na nivoju sestojev pa se giblje med 0,706 v Vipavskih brdih in 0,756 v Zavrču (preglednica 10). V povprečju velja, da je verjetnost, da sta dva naključno izbrana alela na lokusu iz sestoja različna, okrog 72 odstotna ($H_E = 0,726$).

Privatni aleli so prisotni v vseh štirih sestojih. Njihovo število je med 1 v sestoju Ilirska Bistrica in 11 v Vipavskih brdih (priloga C). Število privatnih alelov na lokus znaša med 1 in 3, njihove frekvence pa so nizke, in sicer med 0,007 in 0,100 (podatki niso prikazani). Število alelov, ki je neodvisno od velikosti vzorca (A_R), se giblje med 2,68 (EMPaS14, Vipavska brda) in 10,87 (EMPa015, Zavrč) (priloga C). Multilokusno povprečje alelov, ki je neodvisno od velikosti vzorca (A_R) na nivoju sestojev pa se giblje med 6,14 v Vipavskih brdih in 6,96 na Vrhniku. Lokalno pogostih alelov s frekvenco, večjo od 0,05, ki bi jih našli samo v enem od sestojev ($AL_{\leq 0,25}$), nismo odkrili (slika 10).

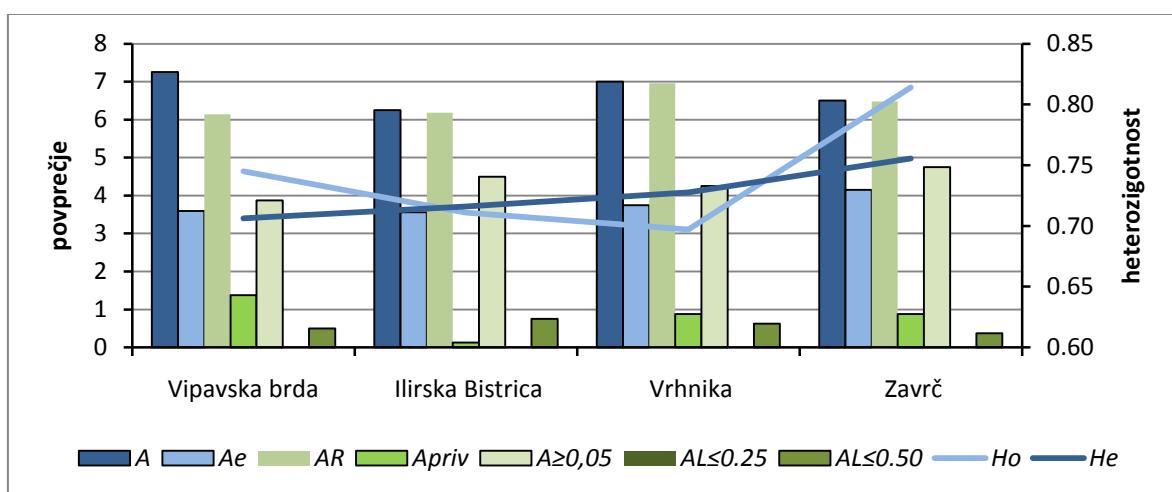
Preglednica 10: Genetska variabilnost sestojev divje češnje, kot jo kaže 8 mikrosatelitskih lokusov. (N) število dreves; (A) povprečno število vseh alelov v sestojtu na lokus; (A_e) efektivno število alelov; (H_O) opažena heterozigotnost; (H_E) povprečna pričakovana heterozigotnost; (F_{IS}) Wrightov koeficient inbridinge. Stopnje značilnosti so z uporabo sekvenčnega Bonferronijevega popravka prilagojene za multiple primerjave (Rice, 1989) (n.s. $P > 0,05$; * $0,01 < P < 0,05$; ** $0,001 < P < 0,01$; *** $P < 0,001$)

Table 10: Statistics of genetic variation within stands at eight micorsatellite loci. (N) number of trees; (A) number of alleles; (A_e) effective number of alleles; (H_O) observed heterozygosity; (H_E) expected heterozygosity; (F_{IS}) fixation index. Significance levels are adjusted using sequential Bonferroni according to Rice (1989) (* $0,01 < P < 0,05$; ** $0,001 < P < 0,01$; *** $P < 0,001$)

parameter → sestoju ↓	N^A	A	A_e	H_O	H_E	F_{IS}
Vipavska brda	69	7,25	3,60	0,745	0,706	-0,055 n.s.
Ilirska Bistrica	32	6,25	3,56	0,711	0,716	0,007 n.s.
Vrhnik	31	7,00	3,74	0,697	0,728	0,043 n.s.
Zavrč	31	6,50	4,15	0,814	0,756	-0,079 n.s.
povprečje		6,75	3,76	0,742	0,726	-0,021 n.s.
SE		0,36	0,18	0,019	0,014	0,060

^A eno drevo na genotip

Primerjava med opaženo (H_O) in pričakovano (H_E) heterozigotnostjo v sestojih (preglednica 10, slika 10) kaže na pomanjkanje heterozigotov ($F_{IS} > 0$) v sestojih Vrhnika in Ilirska Bistrica, vendar razlike statistično niso značilne. Neznačilne razlike so tudi v sestojih Zavrč in Vipavska brda, kjer pa je opažena heterozigotnost višja od pričakovane ($F_{IS} < 0$).



Slika 10: Povprečne vrednosti alelnih kazalnikov v sestojih divje češnje. (A) povprečno število vseh alelov na lokus; (A_e) efektivno število alelov; (A_R) število alelov neodvisno od velikosti vzorca; (A_{priv}) število privatnih alelov; ($A_{\geq 0,05}$) število alelov s frekvenco enako ali večjo od 0,05%; ($A_{\leq 0,25}$) število lokalno pogostih alelov, ki jih najdemo v 25 % ali manj sestojih; ($A_{\leq 0,50}$) število lokalno pogostih alelov, ki jih najdemo v 50 % ali manj sestojih; (H_E) genska diverziteta; (H_O) opažena heterozigotnost

Figure 10: Mean values of allele indices for wild cherry seed stands. (A) number of alleles per locus; (A_e) effective number of alleles; (A_R) allelic richness; (A_{priv}) number of private alleles; ($A_{\geq 0,05}$) number of locally common alleles found in 25 % or less stands; ($A_{\leq 0,50}$) number of locally common alleles found in 50 % or less stands; (H_E) expected heterozygosity; (H_O) observed heterozygosity

Skupna genetska variabilnost divje češnje v štirih sestojih je velika ($H_T = 0,749$; preglednica 9), medtem ko so razlike med sestoji majhne, vendar statistično značilne ($F_{ST} = 0,04$; $G'_{ST} = 0,137$ (op. statistika G'_{ST} praviloma kaže nekoliko višje ocene razlikovanja). Medsestojna primerjava kaže, da so najmanjše genetske razlike med sestojema Ilirska Bistrica in Vipavska brda in največje med sestojema Vrhnika in Vipavska brda (preglednica 11).

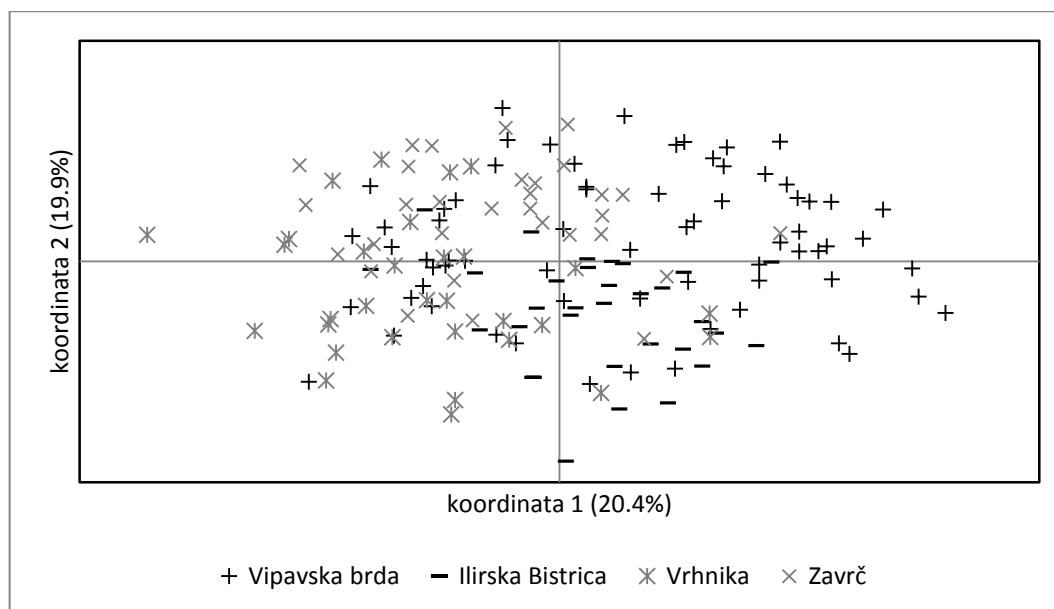
Preglednica 11: Multilokusne cenilke sestojnih genetskih razdalj F_{ST} in G'_{ST} . Vrednosti G'_{ST} so prikazane v oklepajih

Table 11: Stand pairwise F_{ST} in G'_{ST} in the brackets

	Vipavska brda	Ilirska Bistrica	Vrhnika
Ilirska Bistrica	0,033 (0,099)		
Vrhnika	0,053 (0,163)	0,036 (0,112)	
Zavrč	0,037 (0,119)	0,044 (0,148)	0,039 (0,132)

permutacijski testi (program SPAGeDi) so za vse parne primerjave pokazali značilne razlike

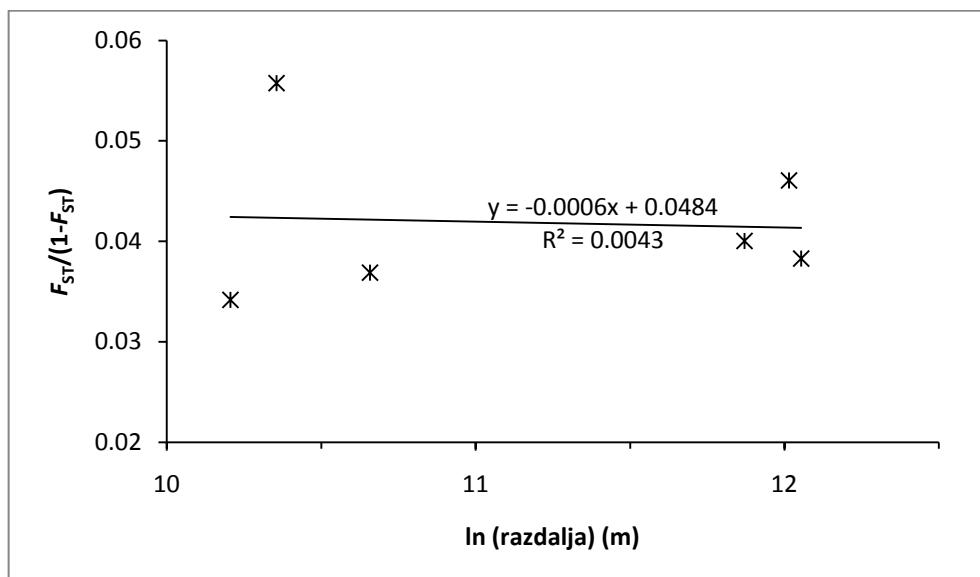
S pomočjo analize glavnih koordinat prikazujemo vzorec genetskih razmerij med drevesi posameznih sestojev (slika 11). Prva os pojasnjuje 20,36 % in druga 19,90 % skupne variabilnosti. Kontinuiran raztros in močno prekrivanje točk (dreves) vzdolž prve in druge osi onemogočata razlikovanje med posameznimi sestoji divje češnje. Veliko prekrivanje je posledica velike genetske variabilnosti znotraj sestojev in majhne variabilnosti med sestoji, ki znaša le 4 odstotke (preglednica 9). Majhne medsestojne razlike se zrcalijo tudi v visokem številu reproduktivno uspešnih migrantov na generacijo $Nm = 5,0$.



Slika 11: PCoA analiza: razpršenost dreves divje češnje vzdolž prve in druge sintetične koordinate

Figure 11: Distribution of the first two coordinates according to the PCoA analysis. Symbols represent individual genotypes

Analiza 'izolacije kot posledice razdalje' je pokazala, da genetska divergenca med 4 sestoji divje češnje ni v povezavi z geografsko oddaljenostjo, saj z Mantelovim testom nismo uspeli potrditi značilnosti korelacijskega koeficiente (slika 12, Mantel test: $R^2 = 0,004$; $p = 0,41$). Z modelom 'izolacije kot posledice razdalje' je tako pojasnjeno le 0,4 % celotne variabilnosti.



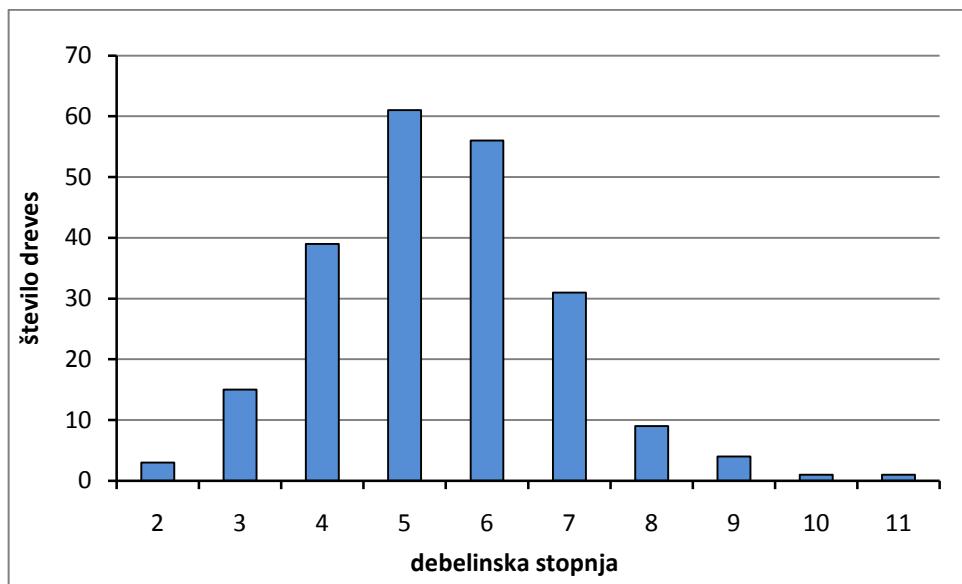
Slika 12: Razmerje $F_{ST} / (1 - F_{ST})$ med pari sestojev na logaritemski skali oddaljenosti

Figure 12: Plot of $F_{ST} / (1 - F_{ST})$ ratios against the logarithm of distances among analysed seed stands

4.7 SEMENSKI OBJEKT VIPAVSKA BRDA

4.7.1 Debelinska in starostna struktura sestoja

V sestaju Vipavska brda smo vsem osebkom divje češnje, katerih prsní premer je presegal 5 cm, s pomočjo π -traka le-tega izmerili. Premeri 217 dreves so se gibali v intervalu med 8,8 cm in 50,1 cm, z aritmetično sredino 24,5 cm (stand. odklon = 7,28 in KV(%) = 29,7). Porazdelitev prsnih premerov oz. frekvenčna krivulja, ki prikazuje število dreves glede na debelinsko stopnjo (slika 13) kaže enovršno in nekoliko pozitivno asimetrično porazdelitev in s tem enomerno zgradbo dreves divje češnje v sestaju (op. odstopanj od normalne porazdelitve, s Kolmogorov–Smirnovim testom, nismo odkrili $p > 0,05$).



Slika 13: Frekvenčna porazdelitev dreves divje češnje po debelinskih stopnjah v sestoju Vipavska brda

Figure 13: Frequency distribution of wild cherry trees according to d.b.h. classes in the seed stand Vipavska brda

Na podlagi rezultatov genetske analize, kjer smo potrdili obstoj klonov, smo za nekatere najštevilčnejše klonske skupine v Vipavskih brdih opravili podrobnejšo analizo debeline in starosti dreves (preglednica 12).

Preglednica 12: Osnovni kazalniki debelinske in starostne strukture sedmih najštevilčnejših klonskih skupin
 Table 12: Basic indicators of breast diameter and age structure of the seven largest clone groups

klonska skupina	št. dreves v klonu	debelina ^a			starost ^b	
		\bar{x} (cm)	stand. odklon	KV (%)	\bar{x} (leto)	interval (leto)
1	16	24,45	5,86	23,98	70,80 ⁵	66–78
2	11	23,97	9,48	39,56	61,80 ⁵	45–71
3	9	18,67	8,73	46,76	67,50 ⁶	59–90
4	18	20,04	6,71	33,48	75,80 ⁵	70–79
5	21	29,13	6,70	22,99	70,00 ⁵	60–78
6	9	29,19	3,14	10,75	67,33 ⁶	58–74
7	11	28,95	8,84	30,53	73,50 ⁶	69–81

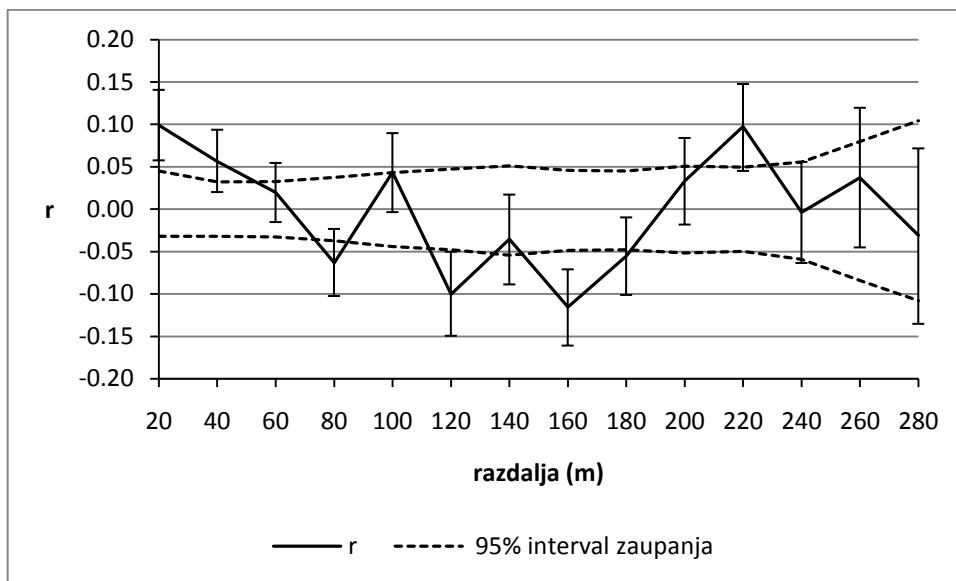
^a vrednosti izračunane iz vseh ramet v skupini

^b vrednosti izračunane na podlagi petih (⁵) oz. šestih (⁶) najdebelejših dreves iz klonske skupine

Srednji premer dreves v sedmih najštevilčnejših klonskih skupinah se je gibal v intervalu med 18,6 cm in 29,2 cm s koeficientom variacije med 10,7 % in 46,8 %. Razlike v povprečnih prsnih premerih dreves v 7 skupinah smo potrdili s Kruskal-Wallisovim testom, $H(6) = 24,74$, $p < 0,001$ (program IBM SPSS Statistics ver. 21).

Povprečna starost petih oz. šestih najdebelejših dreves v analiziranih skupinah se je gibala med 61 in 76 leti. Razlike v letih znotraj skupin so znašale med 9 in 31 leti, medtem ko je celotni razpon starosti prek vseh analiziranih dreves znašal od 45 do 90 let.

Z namenom podrobnejše proučitve prostorsko–debelinske strukture smo sestoj Vipavska brda razdelili na 20–metrske intervalne razrede, znotraj katerih smo za vse pare dreves izračunali razlike v velikosti prsnih premerov. Na ta način smo želeli preveriti, ali so si prostorsko bližja drevesa podobna tudi po debelini, s čimer bi potrdili značilno prostorsko–debelinsko strukturo sestoja.



Slika 14: Korelacijski koeficient 'r' predstavlja povezavo med razlikami v prsnem premeru in geografsko oddaljenostjo med pari dreves, katerih geografska oddaljenost spada v določen intervalni razred

Figure 14: The correlation coefficient 'r' represents the relationship between differences in breast diameter and geographical distance between pairs of trees whose geographical distance is within a certain interval class

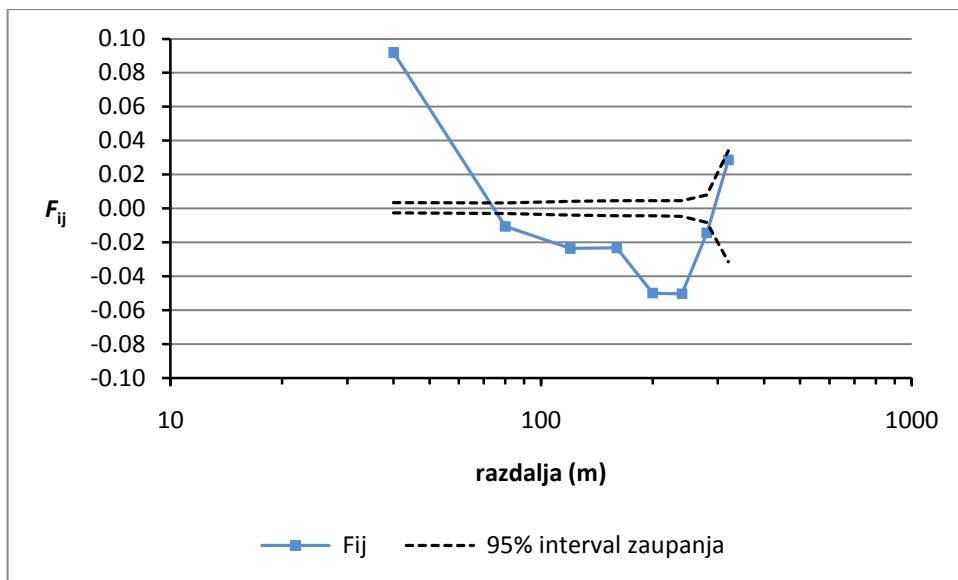
Slika 14 prikazuje prostorsko–debelinsko strukturo sestoja. Na sliki je razvidno, da je korelacijski koeficient med razlikami v debelini in geografsko oddaljenostjo med pari dreves (r) v razredu do 40 m večji, kot bi bilo to pričakovati po naključju. Večje razlike v debelini od pričakovanih se kažejo med drevesi, ki so medsebojno oddaljena med 80 in 180 m, izjema je razred oddaljenosti od 80 do 100 m.

4.7.2 Prostorsko–genetska struktura sestoja

4.7.2.1 Učinek vegetativnega razmnoževanja na prostorsko–genetsko strukturo sestoja

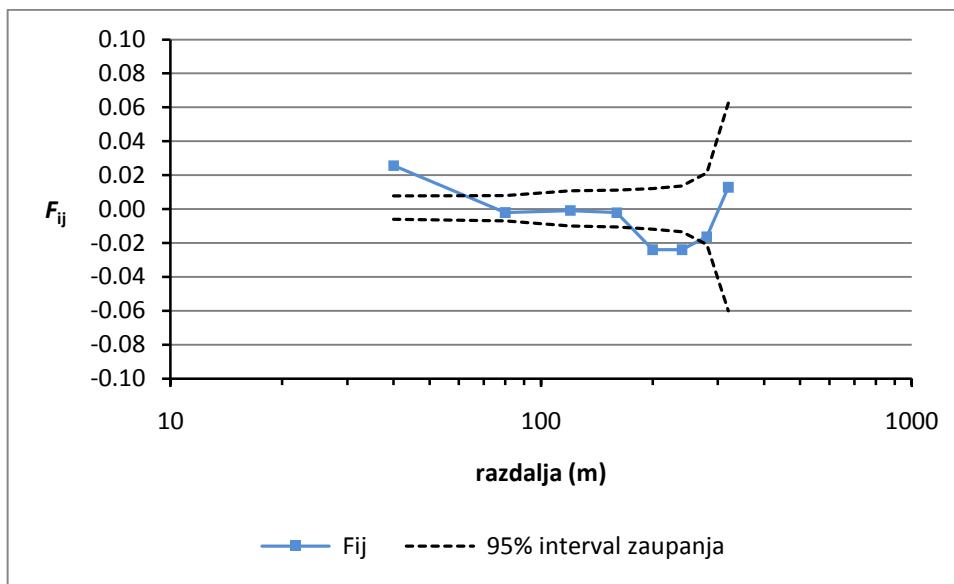
Z namenom podrobnejše proučitve prostorsko–genetske strukture smo celotni sestoj Vipavska brda razdelili na 40 metrske intervalne razrede, znotraj katerih smo med vsemi drevesnimi pari izračunali koeficiente sorodnosti ter jih prikazali na logaritemski skali oddaljenosti. Rezultati kažejo, da je učinek vegetativnega razmnoževanja na prostorsko–genetsko strukturo divje češnje v sestaju Vipavska brda velik (slika 15). Posledica prostorske bližine identičnih genotipov je nenaključna razporeditev le–teh v prostoru. Koeficient sorodnosti ima ob upoštevanju vseh dreves iz klonskih skupin izrazito največjo vrednost v prvem razredu

oddaljenosti (< 40 m). Do te oddaljenosti je vrednost koeficienta F_{ij} značilno večja od pričakovane, z večanjem oddaljenosti pa vrednost izrazito pada. To pomeni, da so si drevesa genetsko manj podobna, kot bi si bila podobna v obravnavanem sestoju po naključju.



Slika 15: Prostorsko–genetska struktura na podlagi vseh analiziranih dreves v sestoju, prikazana s koeficientom sorodnosti (F_{ij}) za 40 m razrede na logaritemski skali. Značilnost SGS je prikazana s 95% intervalom zaupanja
Figure 15: Spatial correograms: kinship coefficient (F_{ij}) values are presented for all ramets for each 40 m distance class on a logarithmic scale. Upper and lower 95% confidence limits for each distance classe are indicated by a dotted line

Ob upoštevanju le generativnega izvora dreves se stopnja sorodnosti med drevesi v Vipavskih brdih bistveno zmanjša. Primerjava koeficientov sorodnosti (F_{ij}) za prvi razred oddaljenosti (< 40 m) kaže, da je v primeru upoštevanja le generativnega izvora koeficient več kot 3–krat manjši kot v primeru, ko smo upoštevali tudi vegetativno razmnoževanje (sliki 15 in 16, preglednica 13). V primeru generativnih dreves je značilno SGS zaznati le v prvem razredu oddaljenosti (< 40 m) (slika 16). Večja nihanja vrednosti F_{ij} na daljših razdaljah (sliki 15 in 16) pa so posledica naključne variabilnosti zaradi manjšega števila parnih primerjav dreves.



Slika 16: Prostorsko–genetska struktura na podlagi generativnih dreves, prikazana s koeficientom sorodnosti (F_{ij}) za 40 m razrede na logaritemski skali. Značilnost SGS je prikazana s 95% intervalom zaupanja
Figure 16: Spatial correlograms: kinship coefficient (F_{ij}) values are presented for one ramet per clonal group for each 40 m distance class on a logarithmic scale. Upper and lower 95% confidence limits for each distance classe are indicated by a dotted line

Preglednica 13: Ocene prostorsko–genetske strukturirnosti ločeno za vsa drevesa v populaciji in za eno drevo na klon

Table 13: Spatial genetic structure of all ramets and one ramet per clonal group in the seed stand Vipavska brda

lokus	vsa drevesa (N=217)			eno drevo na genotip (N=69)				% _{veg}
	b	F_1	Sp	b	F_1	Sp		
EMPaS02	-0,099***	0,174	0,119	-0,071**	0,066	0,076	36	
EMPa004	-0,274***	0,092	0,302	-0,066*	0,026	0,067	78	
EMPa005	-0,172***	0,120	0,196	-0,030 n.s.	0,014	0,030	84	
EMPaS06	-0,127***	0,083	0,138	-0,040*	0,028	0,041	70	
EMPaS12	-0,052***	0,039	0,054	0,030 n.s.	-0,004	0,030	44	
EMPa015	-0,093***	0,072	0,100	0,008 n.s.	0,017	0,008	92	
UDP98-412	-0,124***	0,052	0,131	-0,028 n.s.	0,007	0,028	79	
PceGA34	-0,124***	0,102	0,138	-0,023 n.s.	0,032	0,024	83	
skupaj	-0,135***	0,092	0,149	-0,030**	0,026	0,031	79	

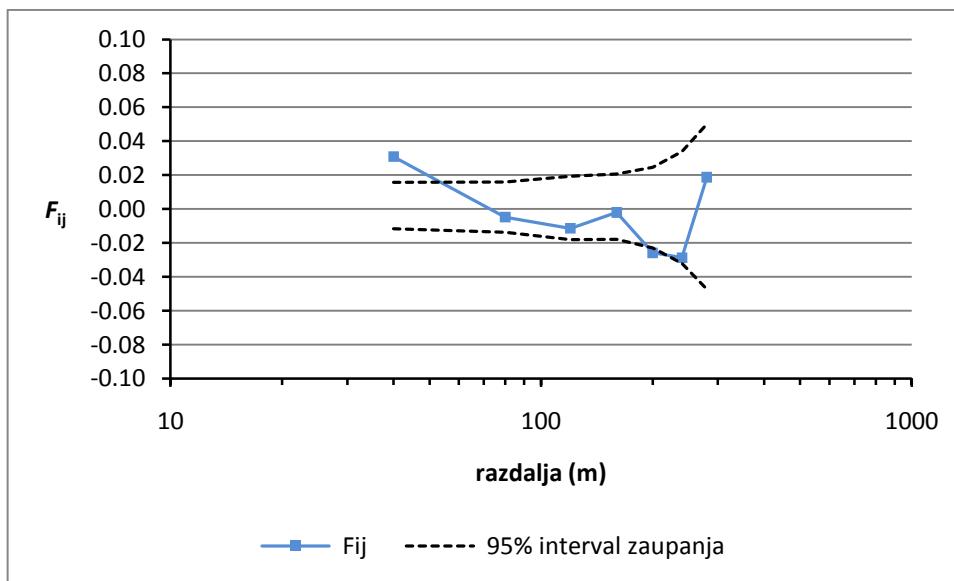
(b) regresijski koeficient, (F_1) povprečna vrednost koeficiente sorodnosti F_{ij} v prvem razdaljnem razredu, (Sp) kazalnik SGS (Vekemans in Hardy 2004), (%_{veg}) učinek (delež) vegetativnega razmnoževanja na SGS. Značilnost regresijskega koeficiente 'b' smo testirali z enostranskim Mantelovim testom z 10.000 permutacijami (n.s. P > 0,05; * 0,01 < P < 0,05; ** 0,001 < P < 0,01; *** P < 0,001)

Celotna intenziteta prostorsko–genetske strukture, ovrednotena s Sp statistiko (Vekemans in Hardy, 2004) kaže, da je stopnja sorodnosti med drevesi v Vipavskih brdih močno odvisna od njihove medsebojne prostorske oddaljenosti. Ob upoštevanju tako generativnega, kot vegetativnega nastanka dreves, je v sestoju opaziti močno prostorsko–genetsko strukturo, $Sp = 0,149$ (preglednica 13). Vrednosti Sp so za posamezne lokuse visoke in se gibljejo med

0,054 (EMPaS12) in 0,302 (EMPa004). Z vključitvijo le enega drevesa na genotip se vrednost Sp za celotni sestoj sicer bistveno zmanjša ($Sp = 0,031$), vendar še vedno nakazuje pomembno prostorsko-genetsko strukturo sestojja (Vekemans in Hardy, 2004). Z vključitvijo le generativnih dreves znašajo vrednosti Sp za posamezne lokuse med 0,008 (EMPa015) in 0,076 (EMPaS02). Prispevek vegetativnega razmnoževanja k prostorsko-genetski strukturi Vipavskih brd je velik (79 %) in se med posameznimi lokusi giblje med 36 % (EMPaS02) in 92 % (EMPa015).

4.7.2.2 Prostorsko-genetska struktura v odvisnosti od debeline dreves

Nenaključna debelinska razporeditev dreves v populaciji v povezavi s fenologijo cvetenja (večja drevesa močneje cvetijo in semenijo) lahko vpliva na prostorsko-genetsko strukturo sestojja. Z namenom proučitve povezave med debelino dreves in SGS smo drevesa generativnega nastanka razdelili v dve, po številu približno enake skupini. Prva skupina je vsebovala drevesa s prsnim premerom manjšim od 24 cm in druga s premerom večjim od 24 cm (op. meja 24 cm je bila določena zaradi zagotavljanja približno enakega števila dreves v obeh vzorcih).

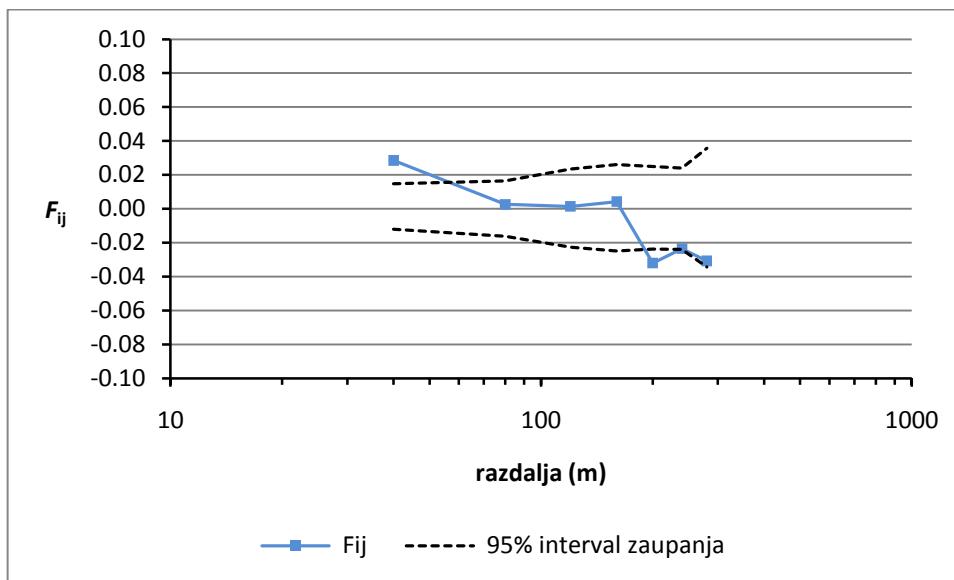


Slika 17: Prostorsko-genetska struktura znotraj dreves generativnega nastanka s prsnim premerom pod 24 cm, prikazana s koeficientom sorodnosti (F_{ij}) za 40 m razrede na logaritemski skali. Značilnost SGS je prikazana s 95% intervalom zaupanja

Figure 17: Spatial correlograms of a small cohort, d.b.h < 24 cm: kinship coefficient (F_{ij}) values are presented for one ramet per clonal group for each 40 m distance class on a logarithmic scale. Upper and lower 95% confidence limits for each distance classe are indicated by a dotted line

Slike 17 in 18 prikazujeta, da so si tako tanjša kot debelejša drevesa do oddaljenosti < 40 m genetsko bliže, kot sta si blizu dve naključni drevesi iz istega sestojja. Tako med debelejšimi kot tanjšimi drevesi je vrednost koeficiente sorodnosti najvišja v prvem razredu oddaljenosti (< 40 m) ter se z razdaljo sorazmerno konstantno zmanjšuje. Relativno velik interval zaupanja

na celotni razdalji proučevanja je posledica majhnega števila dreves v analizi. V primeru tanjših dreves (slika 17) je večje nihanje vrednosti F_{ij} na daljših razdaljah posledica naključne variabilnosti zaradi manjšega števila parnih primerjav dreves.



Slika 18: Prostorsko–genetska struktura znotraj dreves generativnega nastanka s prsnim premerom nad 24 cm, prikazana s koeficientom sorodnosti (F_{ij}) za 40 m razrede na logaritemski skali. Značilnost SGS je prikazana s 95% intervalom zaupanja

Figure 18: Spatial correlograms of a large cohort, d.b.h > 24 cm: kinship coefficient (F_{ij}) values are presented for one ramet per clonal group for each 40 m distance class on a logarithmic scale. Upper and lower 95% confidence limits for each distance classe are indicated by a dotted line

4.7.3 Parametri razširjanja genov v sestoju

Ker ima proučevanje parametrov razširjanja genov smisel le pri generativnem razmnoževanju, smo v analizi upoštevali le eno drevo / genotip. Iz prostorskih podatkov smo izračunali, da je površina, na kateri uspeva 69 v vzorec zajetih dreves z različnim genotipom velika 19.800 m², kar pomeni gostoto $D = 0,0034848$ dreves / m². Ocenjena velikost soseške (ang. neighbourhood size), ki predpostavlja efektivno gostoto (ang. effective density) (D_e) = $D/10$, je relativno majhna in znaša 36,9 dreves (preglednica 15), kar z drugimi besedami pomeni, da se večina spolnega razmnoževanja v Vipavskih brdih zgodi v sošeski, veliki 37 dreves. Izračun velikosti soseške, ki temelji na iterativnem pristopu, se je v našem primeru izkazal za močno odvisnega od efektivne gostote dreves. Pri gostoti $D_e = D/2$ je velikost skoraj 2× večja in znaša 71,3 dreves. V kolikor pa o širjenju genov sklepamo iz ocene $\hat{Nb} \approx -(1 - F_1) / b_{\log}$ (Hardy in Vekemans, 2002), pa znaša velikost $\hat{Nb} = 32,0$ (\hat{Nb} je ocena velikosti soseške po Wrightu, ki jo definira kot $Nb = 4\pi D\sigma^2$).

Preglednica 14: Ocene parametrov razširjanja genov. (Nb) velikost soseske; (σ_g) ocena razdalje širjenja genov v metrih s 95% intervalom zaupanja (v oklepajih)

Table 14: Estimates of gene dispersal parameters. (Nb) neighbourhood size; (σ_g) estimated gene dispersal distances (m) with 95% upper and lower confidence levels in parenthesis

Nb	σ_g (m) ($D_e = D/2$)	σ_g (m) ($D_e = D/5$)	σ_g (m) ($D_e = D/10$)
36,9 (24,2–53,0)	57,1 (53,3–58,4)	75,3 (61,4–88,4)	88,8 (78,2–99,8)

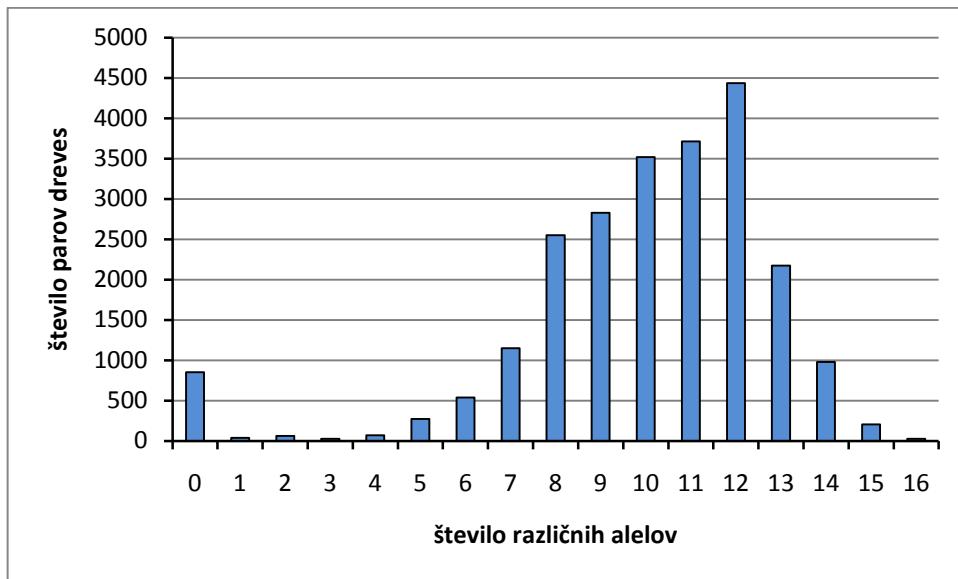
vrednost Nb izhaja iz predpostavke, da je $D_e = D/10$

4.7.4 Somatske mutacije

Nastanek mutacije pomeni trajno vključitev naključne napake v DNA, kar vodi do razlik med izvorno in kopirano sekvenco DNA in kot taka predstavlja osnovni vir genetske variabilnosti (Hamilton, 2009). Medtem ko se mutacije v zarodnih celicah ali njihovih prekurzorjih lahko prenašajo na potomstvo, se somatske mutacije (mutacije, ki nastajajo v procesu mitoze), dogajajo v ne-reproducivnih celicah in so omejene na posamezna tkiva znotraj organizmov (A dictionary of... 2000). Pri rastlinah so lahko somatske mutacije pomemben novi vir genetske variabilnosti tako znotraj osebkov kot med njimi (O'Connell in Ritland, 2004; Pelsy, 2010; Pokorn, 2011). Pri divji češnji, ki se pogosto razmnožuje vegetativno (npr. De Cuyper, 2006; Schueler in sod., 2006), bi do tovrstnih mutacij med drugim lahko prihajalo tudi v zgodnji fazi razvoja meristema, ko nova rastlina požene iz nadomestnih brstov na koreninah.

Porazdelitev števila alelnih razlik med 217 analiziranimi drevesi za vse možne parne primerjave genotipov (skupaj 23.436 primerjav) prikazuje slika 19. Iz slike je razvidno, da imajo številna drevesa enak 8 lokusni genotip (tj. število različnih alelov med pari dreves je enako nič – stolpec 0). Pri drevesih različnih genotipov (stolpci 1–16^d) pa je iz slike razvidno, da so si nekatera med seboj zelo podobna in se razlikujejo le za en ali nekaj alelov (npr. stolpci 1–4). Razlikovanje v 12 aleilih smo zasledili pri največ parih dreves, povprečno pa se dve drevesi v sestoju razlikujeta za 9,97 alelov.

^d Na 8 lokusih je maksimalno število različnih alelov med dvema diploidnima osebkoma 16



Slika 19: Porazdelitev števila alelnih razlik med genotipi dreves v sestoju (za razlago glej tekst).
Figure 19: Distribution of allele differences between the genotypes of trees.

V sestoju Vipavska brda se pet posamičnih dreves in dve skupini s po dvema osebkoma (podskupini) od ostalih, praviloma številčnejših skupin, razlikujejo le na enem izmed osmih lokusov (preglednica 15). V vseh teh primerih drevesa oz. skupine rastejo v neposredni bližini ali so medsebojno prostorsko pomešane (slika 20). Rezultati kažejo na možen pojav somatskih mutacij na posameznih lokusih. Izhajajoč iz relativno visoke starosti našega sestoja in dejstva, da je življenska doba divje češnje med 80 in 100 let sklepamo, da številna izvorna drevesa današnjih klonskih skupin v sestoju niso več prisotna. To potrjujejo tudi podrta in odmrla drevesa, ki smo jih opazili na ploskvi. Zato smo v primeru mutacij kot izvorni genotip obravnavali tistega, ki je bil v sestoju številčnejši. V primeru, ko sta bila oba genotipa enako številčna, smo kot izvornega določili tistega, pri katerem je bil določeni alel pogostejši.

Preglednica 15: Opažene variacije alelov na posameznih mikrosatelitskih lokusih in klonskih skupinah.

Table 15: Allelic variation observed at individual microsatellite loci in separate clonal groups.

skupina	n	vzorčni material	EMPaS02	EMPa004	EMPa005	EMPaS06	EMPaS12	EMPa015	UDP98-412	PceGA34								
/	1	list	141	148	194	194	249	258	206	224	138	145	223	225	113	117	140	151
4	18	<u>list/kambij</u>	<u>141</u>	<u>148</u>	<u>194</u>	<u>194</u>	<u>249</u>	<u>258</u>	<u>206</u>	<u>224</u>	<u>138</u>	<u>145</u>	<u>223</u>	<u>225</u>	<u>117</u>	<u>119</u>	<u>140</u>	<u>151</u>
/	1	kambij	141	148	194	196	249	258	206	224	138	145	223	225	117	119	140	151
7	11	<u>list/kambij</u>	<u>146</u>	<u>148</u>	<u>184</u>	<u>194</u>	<u>247</u>	<u>258</u>	<u>206</u>	<u>224</u>	<u>138</u>	<u>145</u>	<u>225</u>	<u>225</u>	<u>123</u>	<u>123</u>	<u>132</u>	<u>140</u>
/	1	kambij	146	148	182	194	247	258	206	224	138	145	225	225	123	123	132	140
8	2	kambij	146	148	192	192	<u>245</u>	258	206	208	145	145	225	225	119	123	140	151
10	2	<u>list</u>	<u>146</u>	<u>148</u>	<u>192</u>	<u>192</u>	<u>247</u>	<u>258</u>	<u>206</u>	<u>208</u>	<u>145</u>	<u>145</u>	<u>225</u>	<u>225</u>	<u>119</u>	<u>123</u>	<u>140</u>	<u>151</u>
15	7	<u>list</u>	<u>141</u>	<u>146</u>	<u>190</u>	<u>192</u>	<u>249</u>	<u>258</u>	<u>206</u>	<u>206</u>	<u>136</u>	<u>138</u>	<u>225</u>	<u>256</u>	<u>123</u>	<u>123</u>	<u>161</u>	<u>165</u>
13	2	list/kambij	141	146	190	192	249	258	206	206	136	138	223	251	123	123	161	165
24	5	<u>list</u>	<u>146</u>	<u>148</u>	<u>184</u>	<u>184</u>	<u>258</u>	<u>258</u>	<u>206</u>	<u>208</u>	<u>138</u>	<u>145</u>	<u>225</u>	<u>254</u>	<u>117</u>	<u>119</u>	<u>134</u>	<u>140</u>
/	1	kambij	146	148	184	184	258	258	206	208	138	145	223	251	117	119	134	140
29	3	<u>list</u>	<u>146</u>	<u>148</u>	<u>184</u>	<u>194</u>	<u>247</u>	<u>249</u>	<u>206</u>	<u>210</u>	<u>138</u>	<u>138</u>	<u>225</u>	<u>225</u>	<u>117</u>	<u>119</u>	<u>153</u>	<u>159</u>
/	1	list	146	148	184	194	247	249	206	210	138	145	225	225	117	119	153	159

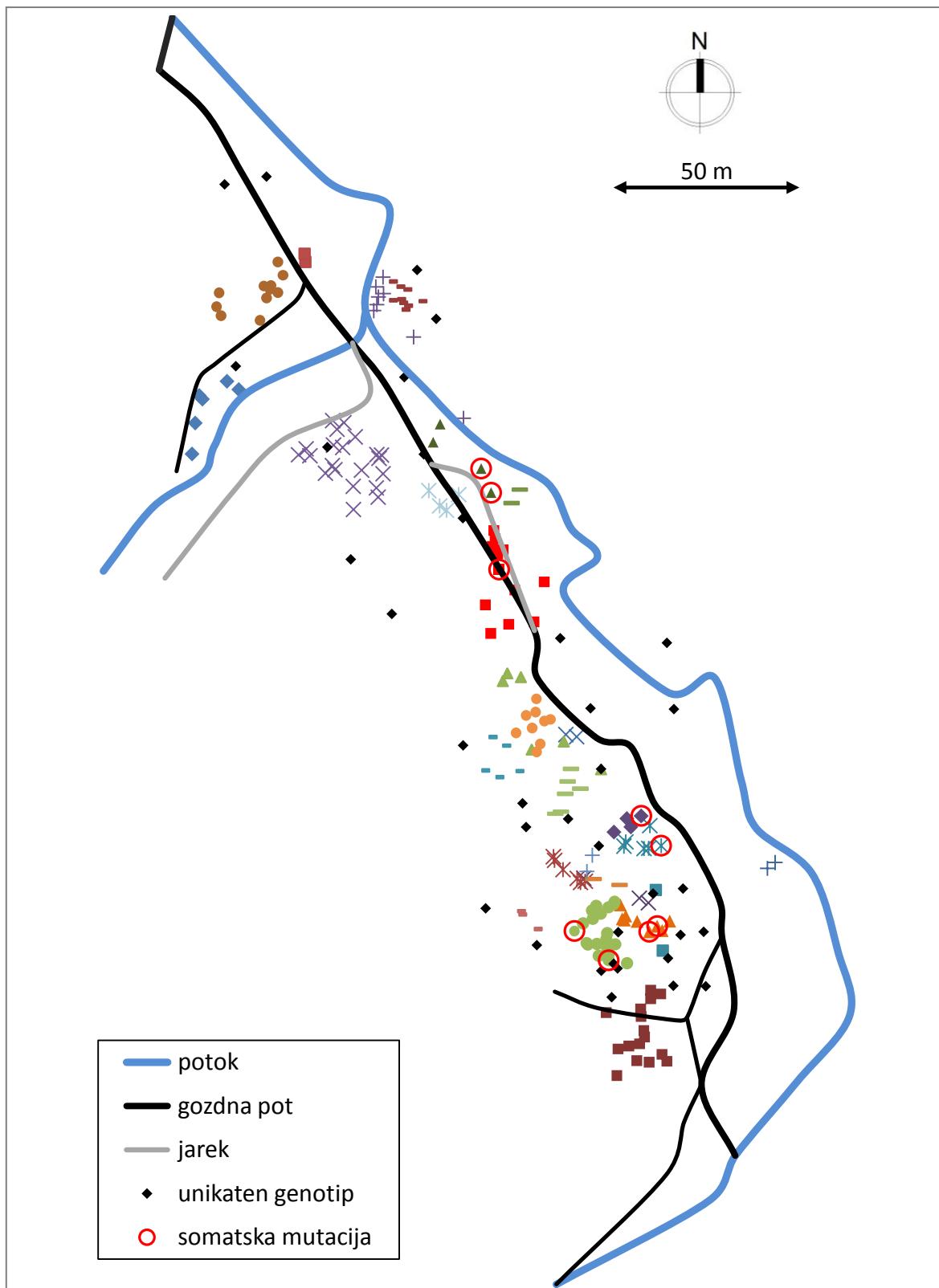
Izvorni genotip (podčrtane vrednosti) je vključen v najštevilčnejšo skupino oz. v primeru, ko sta bila oba genotipa enako številčna, smo kot izvornega določili tistega, pri katerem je bil določeni alel pogostejši, (skupina) zaporedna številka skupine iz priloge B, (n) število dreves v skupini, osenčene vrednosti so variacije alelov na posameznih lokusih

4.7.5 Naravne in umetne ovire pri vegetativnem razširjanju divje češnje v sestoju

Na raziskovalni ploskvi Vipavska brda smo, poleg vseh dreves divje češnje, s pomočjo naprave Trimble GeoXT določili tudi natančne prostorske lokacije ovir, ki bi lahko vplivale na vegetativno širjenje vrste. Od naravnih ovir sta bila na ploskvi evidentirana in prostorsko natančno določena dva potoka in dva jarka, ovire antropogenega izvora pa so predstavljale gozdne poti.

Slika 20 prikazuje prostorsko razmestitev dreves divje češnje in položaj evidentiranih ovir. Iz slike je razvidno prostorsko grupiranje dreves v posameznih klonskih skupinah s povprečnimi razdaljami med drevesi v intervalu od 2,7 m do 21,6 m. Maksimalne razdalje med drevesi enakega genotipa pa so znašale med 2,7 m in 55,7 m (priloga B).

Drevesa iz istih klonskih skupin v večini primerov ne segajo preko bližnjih ovir. Dno struge obeh potokov, ki je v povprečju široko 3–4 metre, in sega do kamnite matične podlage, predstavlja za vegetativno razširjanje preko odganjanja iz korenin močno oviro. Nekoliko šibkejšo oviro predstavljajo gozdne poti in naravni jarki (slika 20), ki vegetativnega razširjanja sicer ne preprečujejo, vendar ga otežujejo. Globina tal na poteh in na dnu naravnih jarkov je v primerjavi z okoliškimi tlemi manjša, popolna odsotnost razvitih tal (tj. matična podlaga je vidna na površini) pa se pojavlja le mestoma. Poti in jarki v sestoju pa predstavljajo tudi pomembno infrastrukturo pri odvajjanju vode ob močnejših nalivih. Na ta način prihaja do erozije ter preprečevanja nastajanja razvitejših tal.



Slika 20: Prostorska razmestitev dreves divje češnje v sestoju Vipavska brda glede na naravne pregrade in poti. Enak znak pomeni enak genotip, razen v primeru črnega romba (♦), kjer znak predstavlja 'unikatna' drevesa, ki ne pripadajo nobeni od klonskih skupin. V primeru gozdnih poti označuje debelejša črta širšo in v teren močnejše ugreznjeno pot, medtem ko je tanjša črta znak za ožjo in manj ugreznjeno pot.

Figure 20: Spatial distribution of wild cherry trees in the stand Vipavska brda according to natural barriers and pathways. The symbol groups represent different genotypes, except in the case of black diamonds (♦), which represent 'unique' trees that do not belong to any clonal group. In the case of forest paths, the thicker line indicates a broader and more sunken path, while the thinner line shows a narrower and less sunken path.

5 RAZPRAVA

Raziskovalne ploskve, na katerih smo izvajali raziskavo, so v štirih izbranih registriranih semenskih objektih, ki hkrati predstavljajo tudi naravne populacije divje češnje v Sloveniji. Po tipu semenskega objekta spadajo Vipavska brda, Ilirska Bistrica in Zavrč v kategorijo semenski sestoj, medtem ko spada Vrhniku v skupino semenjakov (poleg izbranih semenjakov smo v analizo vključili tudi okoliška drevesa). Ne glede na kategorijo bomo, zaradi preglednosti in lažje primerjave z drugimi raziskavami, v razpravi uporabljali izraz sestoj.

5.1 GENETSKA VARIABILNOST ZNOTRAJ SESTOJEV

Genetska variabilnost štirih semenskih objektov divje češnje, ugotovljena s pomočjo analize jedrnih mikrosatelitskih lokusov, je visoka. Število alelov na posameznih lokusih, ki smo jih potrdili v naši raziskavi (preglednici 8 in 9) je primerljivo s številom, ki so jih našli pri divji češnji v drugih podobnih raziskavah (Vaughan in sod., 2007a; Tančeva–Crmarić in sod., 2011). Podobno kot v obeh omenjenih tujih raziskavah se je tudi pri nas za najmanj variabilnega pokazal lokus EMPaS14 s tremi aleli, medtem ko sta bila najvarijabilnejša lokusa Epma015 in PceGA34 s po 16 aleli. Med devetimi lokusi smo le pri dveh potrdili alele, ki so natančno ustrezali dolžini tandemskih ponovitev (preglednica 8). Pojav, katerega so potrdili tudi v drugih raziskavah (npr. Heuertz in sod., 2001; Westergren, 2010; Tančeva–Crmarić in sod., 2011), je posledica posamičnih mutacij (delecij, insercij) na lokusih (Van Oppen in sod., 2000).

Analiza vezavnega neravnovesja je pokazala, da so analizirani lokusi znotraj sestojev medsebojno neodvisni, manjša odstopanja (v treh kombinacijah lokusov EMPa005, EMPaS12, EMPaS02, EMPaS06) smo potrdili le v sestoju Vipavska brda (priloga A). Medtem ko je par lokusov EMPaS02 in EMPaS12 tudi fizično povezan (razdalja med njima znaša 38,5 cM), sta lokusa EMPa005 in EMPaS12 kot tudi lokusa EMPaS02 in EMPaS06 tovrstno nepovezana, saj se nahajata v različnih skupinah povezanih markerjev (Clarke in sod., 2009).

Večina proučevanih lokusov znotraj sestojev je v Hardy–Weinbergovem ravnotežju. Pomanjanje heterozigotov smo potrdili le pri lokusih EMPaS12 in EMPaS14 v sestoju Vrhnika in lokusu EMPaS14 v sestoju Zavrč (preglednici 5 in 6). Na ravni sestojev odstopanj od Hardy–Weinbergovega ravnotežja nismo odkrili, kar je v nasprotju z našo predhodno raziskavo (Jarni in sod., 2012). Predhodna raziskava je za sestoja Vipavska brda in Vrhnika pokazala značilna odstopanja od H–W ravnotežja; v objektu Vrhnika smo zaznali pomanjanje heterozigotov (4,4 % manj od pričakovanih), medtem ko smo v Vipavskih brdih potrdili njihov presežek (4,4 % več od pričakovanih). Pri razširjeni in ponovni analizi, v katero smo poleg vseh 131 vzorcev iz prvotne analize, opravljene na Inštitutu za naravo in Gozd v Belgiji (INBO, Geraardsbergen), vključili tudi 181 novih vzorcev, odstopanj od Hardy–

Weinbergovega ravnovesja na globalni ravni nismo več potrdili. Vzrok je najverjetneje več. Kot kaže, je bil prvotno ugotovljeni presežek heterozigotov v Vipavskih brdih posledica majhnega vzorca (število različnih genotipov prvič 11, drugič 69), medtem ko je v primeru Vrhnika takšnih dejavnikov več. Kot prvega velja omeniti, da smo zaradi velike verjetnosti prisotnosti ničelnih alelov iz analize izključili lokus EMPaS14, ki je bil v predhodno analizo vključen. Napačna identifikacija, povezana s prisotnostjo ničelnih alelov lahko privede do nepravilne ocene frekvence alelov in s tem do podcenjevanja heterozigotnosti (Wattier in sod., 1998), kar bi bil lahko razlog prvotno ugotovljenega pomanjkanja heterozigotov. V našem primeru je bil najverjetnejši vzrok pojavljanja ničelnih alelov dominanca pomnoževanja kratkega alela. Pri določanju njihove velikosti smo namreč nekajkrat opazili vzorec, ko je bil krajši alel (198 bp) pomnožen normalno, medtem ko je krivulja elektroferograma na mestu daljšega alela (213 bp) le nekoliko 'vzvalovila' (vrednosti na y-osi so se nahajale pod 200 enotami), s čimer se je nakazala možnost obstajanja alela. Drugi vzrok, ki je lahko pripeljal do razhajanju, je uporaba različnih instrumentov za elektroforezno analizo, kot je na primer avtomatski sekvenator (Koumi in sod., 2004). V primerjavi z belgijsko analizo, kjer na posameznih lokusih pri nekaj vzorcih nismo dobili produktov kljub 3 kratnim ponovitvam (PCR reakcija in ločevanje na sekvenatorju), smo pri ponovni analizi prišli do produktov praktično pri vseh lokusih in vzorcih (brez potrebnega ponavljanja). Tako smo prišli do rezultatov, ki so se nekoliko razlikovali od prvotnih. V sestoju Vrhnika smo na primer pri dveh drevesih odkrili identičen genotip, posledica česar je zmanjšanje števila dreves v analizi ($32 \rightarrow 31$). Vsi zgoraj omenjeni vzroki pa so najverjetneje delovali tudi sinergijsko, tj. v smeri 'korekcije' prvotno ugotovljenega Hardy–Weinbergovega neravnovesja.

Naša raziskava je pokazala, da opažena variabilnost ni bistveno odvisna od velikosti površine vzorčenja. Do podobnih ugotovitev glede odnosa med velikostjo populacij in zaznano variabilnostjo so prišli tudi pri breku (*Sorbus torminalis*), kjer se je pokazalo, da manjša populacija ne pomeni nujno tudi manjše genetske diverzitete (Hoebee in sod., 2006). V naši raziskavi smo zasledili največjo variabilnost v sestoju Zavrč (preglednica 10), kjer smo vzorčili na površini 11 hektarjev, medtem ko sta bili površini vzorčenja v sestojih Vrhnika in Ilirska Bistrica bistveno večji (16 in 55 ha). Izsledki v primeru semenskega sestoja Zavrč kažejo, da z negovanjem gozda in rednim izbiralnim redčenjem, ki ga izvajamo skozi celoten razvoj sestoja, ne vplivamo na njegovo nevtralno genetsko variabilnost. Na podlagi analiz mikrosatelitskih lokusov Vaughan in sod. (2007a) ugotavljajo, da lahko gojitveni ukrepi, kot je na primer redčenje, pri divji češnji ohranjajo ali celo povečujejo prostorsko–genetsko strukturo na krajsih razdaljah (op. povečevanje SGS pomeni prostorsko kopiranje genotipov in posledično prostorsko kopiranje alelnih frekvenc. V populacijah z naključnim razmnoževanjem in brez vpliva človeka takšnih prostorsko–genetskih struktur ni). Omenjeni trditvi v prid govori tudi dejstvo, da je veliko gospodarsko in ekonomsko pomembnih lastnosti pod močno genetsko kontrolo (npr. Nepveu, 1993; Muranty in sod., 1998; Jensen, 2000; Nocetti in sod., 2010). Odstranjevanje nezaželenih fenotipov lahko vodi do homogenizacije in pospeševanja skupin sorodnih dreves z želenimi lastnostmi, kar se izraža v

povečanju prostorsko-genetske strukturiranosti sestojev (Vaughan in sod., 2007a). Slednje je še posebej potrebno upoštevati pri načrtovanju in snovanju semenskih sestojev. Pri tem nas ne sme voditi samo superiornost posameznih dreves, temveč je treba nameniti pozornost tudi njihovi enakomerni razporeditvi v sestoju. Z 'enakomernostjo' namreč preprečujemo pospeševanje celotnih sorodnih skupin dreves, ki so lahko sicer fenotipsko superiorna, vendar zaradi bližnje sorodnosti nosijo manj genetske variabilnosti (slika 21). To nam lahko pojasni tudi nekoliko večjo genetsko variabilnost semenskega sestoja Zavrč, kjer so drevesa bolj ali manj enakomerno razporejena v sestoju, kar najverjetneje pomeni, da izhajajo iz večjega genetskega bazena staršev. Upravičeno lahko domnevamo tudi, da je gozdarjem uspelo iz osebkov s slabšimi genetskimi zasnovami vzgojiti tudi nekaj kvalitetnih dreves. To je mogoče, saj lahko visoka fenotipska plastičnost prekrije genetsko manj determinirane kvantitativne znake, kot so premer, višina in vitalnost dreves, ki pa imajo v gozdarstvu pomembno vlogo. Brez testiranje potomstva takšnih dreves ne moremo razlikovati od dreves z boljšimi genetskimi zasnovami, kar pomeni, da bodo prenašala svoje gene na naslednje generacije in tako upočasnjevala genetsko izboljšanje sestoja. Na drugi strani kažeta nekoliko manjšo genetsko variabilnost sestoja Ilirska Bistrica in Vrhnika, ki sta v nedavni preteklosti nastala z naravnim zaraščanjem večjih površin. Njuna manjša variabilnost bi bila lahko posledica manjšega genetskega bazena starševskih dreves, in sicer tako po številu dreves kot po njihovi genetski variabilnosti.



Slika 21: Znaka, ki nakazujeta vegetativni nastanek divje češnje, sta velika gostota dreves v sestoju in majhna razdalja med posameznimi drevesi. Velikost in odraslost dreves nas ne smeta zavesti glede njihovega izvora
Figure 21: A visual feature that indicates the vegetative origin of wild cherry is its high density in the stands and short distances between individual trees. Adulthood and the size of individual trees should not mislead us about their origin (Jarni, 2008; Kolovrat)

5.2 GENETSKA VARIABILNOST MED SESTOJI

V splošnem lahko rečemo, da je vzorec genetske variabilnosti pri divji češnji podoben vzorcu, ki je značilen za dolgoživeče in tuje prašne drevesne vrste (Vekemans in Hardy, 2004; Derory in sod., 2002; Heuertz in sod., 2004b; Westergren, 2010), ki ga odlikuje velika genetska variabilnost ($H_E = 0,726$), nizka stopnja razmnoževanja v sorodstvu ($F_{IS} = -0,029$) in majhno med-populacijsko razlikovanje ($F_{ST} = 0,040$; $G'_{ST} = 0,137$). Privatni aleli v posameznih sestojih imajo nizko frekvenco, pojavljajo pa se, z izjemo enega primera, vedno v heterozigotnem stanju.

Genetske primerjave med sestoji so pokazale, da so najmanjše razlike med sestojema Ilirska Bistrica in Vipavska brda (preglednica 11). Ugotovitev je v skladu s pričakovanji, saj na podlagi Pravilnika o določitvi provenienčnih območij (2003) oba sestoja izhajata iz submediteranske ekološke regije (Kutnar in sod., 2002), med vsemi štirimi sestoji pa sta si tudi geografsko najbližja (zračna razdalja med njima znaša 28 km). Nekoliko manj pričakovano so največje razlike med sestojema Vipavska brda in Vrhniko, ki sta zračno oddaljena vsega 32 km, medtem ko so razlike med sestojem Zavrč in drugimi tremi, od katerih je prvi v povprečju oddaljen 160 km, manjše. Eden od razlogov za nejasne geografsko pogojene razlike je zagotovo velika znotraj populacijska in majhna med populacijska variabilnost, ki je značilna tudi za druge tujeprašne drevesne vrste (npr. Derory in sod., 2002; Heuertz in sod., 2004b). Razlike zmanjšuje tudi velik pretok genov, ki ga zagotavlja živali z raznašanjem semen. Pri divji češnji bi bila majhna med-populacijska variabilnost lahko povezana z njenim kompleksnim mehanizmom gametofitne nezdružljivosti, v katerega je vključeno večje število S-alelov (Schueler in sod., 2006). Omenjeni mehanizem bi lahko prek indirektnega pospeševanja pretoka genov zmanjševal medpopulacijske razlike. Na novo prispeli genotipi, z redkimi S-aleli, bi lahko imeli v primerjavi s pogostejšimi in že uveljavljenimi aleli, višji fitnes, kar posledično vodi tudi k zmanjševanju razlik med populacijami (Schueler in sod., 2006). Uspešnost oz. intenziteta pretoka genov se v naši raziskavi kaže tudi v visoki oceni števila reproduktivno uspešnih migrantov na generacijo ($Nm = 5,0$). Groba ocena na dolgi rok je, da naj bi za nadomestilo izgube alelov zaradi genetskega zdrsa zadostovala ena uspešna migracija na generacijo (Spieth, 1974), medtem ko empirični podatki kažejo, da je za 'nevtraliziranje' zdrsa potrebnih več (od 1 do 10) uspešnih migracij na generacijo (Mills in Allendorf, 1996).

Razlikovanje med sestoji smo žeeli vizualno prikazati z uporabo metode glavnih koordinat (slika 11). Prvi dve osi, ki pojasnjujeta 20,36 % in 19,90 % skupne variabilnosti, povzročata kontinuiran raztres in veliko prekrivanje točk (dreves), kar nakazuje na veliko genetsko podobnost analiziranih sestojev. Kljub ugotovljenim majhnim razlikam smo le-te analizirali glede fenomena izolacije kot posledice razdalje. Rezultati so pokazali, da genetska divergenca ni v povezavi geografsko oddaljenostjo sestojev (slika 12).

Izsledki naše raziskave podpirajo pravno ureditev provenienčnih območij za divjo češnjo pri nas. Zanjo Pravilnik (2003) določa celotno Slovenijo kot enotno provenienčno območje. Raziskava je sicer pokazala, da so najmanjše razlike med sestojema Ilirska Bistrica in Vipavska brda, ki pripadata isti, tj. submediteranski ekološki regiji, vendar so razlike majhne in istega velikostnega razreda tudi pri ostalih dveh sestojih, ki izvirata iz predalpske (Vrhnika) in predpanonske (Zavrč) ekološke regije. Zaradi majhnih genetskih razlik med semenskimi sestoji pa je lahko nizko tudi njihovo število.

5.3 STRUKTURA SESTOJA VIPAVSKA BRDA

Raziskovalni objekt Vipavska brda nam je zaradi svojih posebnosti, kot sta i) mikrogeografska lega – objekt leži na dnu ožje doline in je praktično iz vseh strani neba omejen z bolj ali manj strmimi pobočji in ii) velika gostota dreves divje češnje, omogočil analizo in vpogled v prostorsko–genetsko strukturo sestoja, kot tudi njeno povezavo z debelino dreves.

5.3.1 Debelinska in starostna struktura sestoja

Frekvenčna krivulja prsnih premerov divje češnje je pokazala enovršno in rahlo pozitivno asimetrično porazdelitev in s tem enomerno zgradbo (slika 13). Kotar (2005) lastnosti takšne porazdelitve pripisuje predvsem enodobnim in čistim sestojem. Frekvenčna krivulja se v našem primeru nanaša samo na meritve, narejene na divji češnji, zato bi bila le–ta nekoliko drugačna, v kolikor bi v analizo vključili tudi druge drevesne vrste. Kljub nepopolnemu vzorcu pri merjenju debelin (le ena drevesna vrsta) lahko na podlagi izkušenj in terenskih opažanj trdimo, da obravnavani sestoj kaže značilno enomerno zgradbo, strnjen drevesni sklep pa uspešno preprečuje nastanek pomladka, saj mladih dreves in mladik divje češnje na ploskvi nismo zasledili.

Kljub temu, da debelinska struktura divje češnje nakazuje enodobno zgradbo sestoja, je starostna analiza izbranih dreves pokazala, da je sestoj nastajal v daljšem časovnem obdobju. Povprečna starost najdebelejših dreves v najštevilčnejših klonskih skupinah znaša med 60 in 75 let, medtem ko je starost posameznih dreves v razponu med 45 in 90 leti. Ugotovljena starost kaže, da nastanek sestoja ni vezan na en dogodek v preteklosti, ki bi lahko sprožil obnovo, kot je npr. velika naravna ali umetna motnja, na kar sicer namiguje vegetativni nastanek številnih dreves kot tudi drevesna in debelinska struktura sestoja. Slednja se je v analizi pokazala kot še posebno nezanesljiva nakazovalka starosti, o čemer pri divji češnji poroča tudi Vaughan in sod. (2007b). Stopnja povezanosti med debelino in starostjo dreves, izražena s Pearsonovim korelačijskim koeficientom, je v Vipavskih brdih znašala 0,29 ($p > 0,05$). Eden od razlogov za omenjeno majhno odvisnost je slaba negovanost sestoja, ki se kaže v utesnjениh in izredno majhnih krošnjah številnih odraslih dreves, to pa vpliva tudi na debelinsko priraščanje. V obdobju zadnjih 15–25 let je znašala letna debelinska prirast tovrstnih dreves le po eno ali nekaj plasti celic, kar pomeni, da so lahko v primerjavi z

drevesi, ki so imela več rastnega prostora in s tem povezano večjo debelinsko rast, tanjsa, a hkrati starejša. Pomanjkljivo negovanost sestoja poleg omenjenih majhnih krošenj nakazuje tudi opažena slaba vitalnost in kvaliteta dreves, izredno upočasnjeno priraščanje ter za češnjo ugotovljene relativno visoke starosti.

Visoka starost v povezavi z nizko stopnjo odvisnosti med debelino in starostjo dreves otežuje prepoznavanje izvornih dreves pri vegetativnem razmnoževanju. Izvornih dreves v naši raziskavi sicer nismo iskali, vendar lahko na podlagi rezultatov starostne analize trdimo, da današnji sestoj divje češnje v Vipavskih brdih ni sestoj ene, temveč več generacij. To potrjuje tudi genetska analiza, ki je pokazala obstoj somatskih mutacij. Ko namreč neko mutacijo zasledimo na več drevesih, je logična razlaga, da je do mutacije prišlo najprej na enem drevesu, ki je nato prek ponovnega odganjanja iz korenin preneslo mutacijo tudi na vse 'svoje potomce'. Verjetnost, da bi po naključju prišlo do iste mutacije na dveh sosednjih drevesih, je zelo nizka. Skoraj nična je tudi verjetnost, da bi bilo izvorno drevo himera, oz. da bi bila korenina, iz katere so odgnala nova drevesa, zaradi mutacije genetsko različna od preostalega dela drevesa. Omenjeni pojav so zasledili pri orjaškem kleku (*Thuja plicata* D. Don), kjer pa do somatske mutacije ni prišlo na korenini, temveč v krošnji drevesa, zaradi česar je bil zgornji del krošnje genetsko različen od spodnjega (O'Connell in Ritland, 2004). Izvornih dreves torej v analizi nismo iskali, smo pa v primeru somatskih mutacij določili izvorni genotip, tj. prvotni genotip iz katerega se je razvil 'mutiran' genotip. Tako je bil glavni kriterij izvornega genotipa njegova večja številčnost v vzorcu. Npr. najverjetnejši in logičen potek nastanka mutacije bi bil, da se je pri vegetativnem razmnoževanju v enem primeru zgodila mutacija npr. v 11 drugih primerih pa ne, zato smo genotip 11 dreves vzeli za izvornega. Tovrstno 'številčno' določanje izvora temelji na predpostavki, da je do mutacije prišlo v tej generaciji. V kolikor je do nje prišlo že prej pa je kriterij številčnosti pri iskanju izvornega genotipa manj zanesljiv^e. Določitev izvornega genotipa je verjetno zanesljivejša, ko imamo opravka z zelo redkimi aleli. V našem primeru smo imeli dve drevesi z eno različico genotipa in drugi dve drevesi z drugo. Za mutirani genotip smo določili tistega, ki je na določenem lokusu vseboval redkejše alele. V našem primeru so bili to povsem novi aleli, ki jih v populaciji prej še ni bilo^f.

5.3.2 Prostorsko–genetska struktura sestoja

Prve raziskave genetske strukture, narejene s pomočjo izoencimov, so pri divji češnji nakazovale šibko genetsko strukturo populacij (Frascaria in sod., 1993; Gömöry in Paule, 2001), medtem ko so novejše s pomočjo mikrosatelitskih markerjev in S–alelov pokazale značilno prostorsko–genetsko strukturo, s čimer so potrdili omejen raznos semena in cvetnega prahu pri tej vrsti (Schueler in sod., 2006; Vaughan in sod., 2007a; Jolivet in sod., 2011).

^e Iz drevesa A vegetativno požene 'mutirano' drevo B. Čez čas se drevo B podre in iz njegovih korenin odženejo številni odganjki, ki postanejo številčnejši od izvornega genotipa drevesa A.

^f Logično bi bilo, da z naključno mutacijo iz pogostega alela nastane nekaj čisto novega (novi alel) in ne obratno, da edini alel v populaciji mutira v alel, ki je zelo pogost.

Močno in značilno prostorsko–genetsko strukturo v sestoju divje češnje v Vipavskih brdih smo potrdili tudi v naši raziskavi, kjer se je pokazal velik vpliv vegetativnega razmnoževanja. Kar 68 % vseh dreves v analizi je vegetativnega izvora, kar znatno vpliva na prostorsko razporeditev dreves divje češnje v sestoju. Koeficienti sorodnosti (F_{ij}) imajo ob upoštevanju vseh klonskih dreves najvišje vrednosti v prvem razredu oddaljenosti (< 40 m), medtem ko njihova vrednost v naslednjem razredu (40 – 80 m) izrazito pada (slika 15). Znotraj razdalje 40 metrov so si drevesa v povprečju genetsko bolj podobna, kot bi si bila v Vipavskih brdih podobna po naključju. Vizualno potrditev prikazuje slika 20, kjer je prostorsko grupiranje klonskih dreves jasno razvidno s povprečno medsebojno razdaljo do 22 metrov. Do nekoliko večjih razdalj so prišli v Veliki Britaniji, kjer je bila genetska podobnost med drevesi večja od pričakovane do oddaljenosti 120 m (Vaughan in sod., 2007a). Razlike med našo in omenjeno raziskavo najverjetneje izhajajo iz razlik v gostotah populacij. Medtem ko je bila gostota češenj v Vipavskih brdih 110 dreves / ha, je bila v dveh britanskih populacijah 17 oz. 24 dreves / ha. Velika gostota dreves in vegetativno razmnoževanje sta razloga za še zanimivejšo strukturo, ki se kaže v oddaljenosti, večji od 40 m. Drevesa so si od te razdalje naprej genetsko manj podobna, kot bi si bila podobna po naključju. To nakazujejo negativne vrednosti F_{ij} . Manjša podobnost od pričakovane je posledica dejstva, da drevesa, medsebojno oddaljena > 40 m, razen izjem pripadajo različnim, bolj ali manj številnim klonskim skupinam (za razlogo glej opombo spodaj^g). Dobljeni vzorec SGS se lepo prilagaja modelu izolacije kot posledice razdalje (Hardy in Vekemans, 1999; Rousset, 1997, 2000), kjer je koeficient sorodnosti med bližnjimi drevesi značilno višji in med bolj oddaljenimi drevesi značilno nižji, kot bi bilo pričakovati po naključju.

Ob upoštevanju samo generativnega izvora dreves (eno drevo / genotip) pa je stopnja genetske podobnosti v Vipavskih brdih bistveno manjša. V prvem razredu oddaljenosti (< 40 m) je podobnost med drevesi še vedno večja od pričakovane, vendar več kot 3× manjša, kot je bila v zgornjem primeru (vrednost $F_{ij} = 0,026$ in 0,092). Od razdalje 40 m naprej razlik med genetsko podobnostjo dreves v vzorcu in naključno podobnostjo nismo potrdili (slika 16). S pomočjo mikrosatelitskih markerjev in S–alelov je raziskava v Nemčiji pokazala, da so si drevesa divje češnje generativnega izvora genetsko bližje od pričakovanj do oddaljenosti 85 m (Schueler in sod., 2006). V omenjeni raziskavi so oboji uporabljeni markerji pokazali enako prostorsko genetsko strukturo (SGS), kar bi bila lahko posledica i) velikega pretoka genov, ki je prekril učinek frekvenčno–odvisne selekcije na S–lokusih ali ii) prešibke moči mikrosatelitskih markerjev in uporabljenih statističnih metod za zaznavanje tovrstnih razlik. Podobno kot mi so 3–kratno zmanjšanje koeficiente sorodnosti med drevesi samo generativnega izvora dobili Vaughan in sod. (2007a), značilno prostorsko–genetsko strukturiranost pa so potrdili do oddaljenosti 120 m. V obravnavani raziskavi so podoben vzorec SGS dobili tako v gospodarjenem kot v negospodarjenem gozdu. Nasproten učinek

^g Primer: klonska skupina A vsebuje 20 dreves, ki uspevajo v radiju 30 m. Klonska skupina B vsebuje 3 drevesa v radiju 10 m in je od skupine A oddaljena 100 m. Povprečna genetska podobnost vseh dreves iz skupne A z vsemi drevesi iz skupine B (60 primerjav) je manjša kot je povprečna podobnost med naključnimi pari 23 dreves (253 primerjav, od tega jih je 193 med identičnimi genotipi).

gospodarjenja na SGS so potrdili pri vrsti *Sorbus torminalis* (Oddou–Muratorio in sod., 2004). V raziskavi so ugotovili, da ciklična sečnja skupaj z okoljskimi dejavniki opazno oblikuje razporeditev za pomlajevanje ugodnih območij, kamor s pomočjo raznašalcev semen in kot posledica 'skupnega transporta' prispejo sorodna semena. Posredno, preko gostote dreves, so učinek gospodarjenja na SGS potrdili tudi pri vrsti *Fagus crenata* Blume (Asuka in sod., 2004). Pri visokih gostotah dreves naj bi prihajalo do močnejšega prekrivanja semen različnih mater, kar naj bi vodilo k manj izraziti SGS kot v redkejših sestojih z manjšim prekrivanjem.

Na podlagi rezultatov prostorsko–debelinske strukture, kjer so bile razlike v debelini med bližnjimi drevesi v Vipavskih brdih manjše od pričakovanih (tj. grupiranje dreves podobnih debelin do medsebojne oddaljenosti 20 m) (slika 14), smo želeli preveriti, ali obstajajo razlike v SGS tudi med različno debelimi skupinami dreves oz. ali se SGS znotraj tanjših dreves (dbh < 24 cm) razlikuje od SGS znotraj debelejših (dbh > 24 cm). Za obe skupini smo dobili skoraj identičen vzorec SGS s koeficientom sorodnosti (F_{ij}), ki je večji od pričakovanega le v razredu oddaljenosti do 40 m (sliki 17 in 18). Najverjetnejši razlog enakega vzorca SGS med skupinama je v majhni soodvisnosti debeline in starosti dreves ($r_{xy} = 0,29$, $p > 0,05$), ki je posledica nenegovanosti sestoja. Razlike v debelinah dreves niso nastale zaradi različne starosti (v tem primeru bi pričakovali, da so tanjša drevesa nova generacija in potomci starejših ter da se zaradi omejenega raznosa genov močneje grupirajo v prostoru), temveč pomanjkljive nege, zaradi česar imamo v sestoju veliko utesnjenih, slabo priraščajočih in zato tanjših dreves. Oziroma drugače, ker lahko tako debelejša kot tanjša drevesa pripadajo isti starostni generaciji, razlik v SGS med njimi nismo odkrili. Vaughan in sod. (2007a) so podoben vzorec SGS med skupinami različno debelih dreves odkrili v negospodarjenem gozdu. Izrazito SGS do oddaljenosti < 40 m pa so odkrili v skupini debelejših dreves gospodarjenega gozda, kar naj bi bilo v nasprotju s pričakovanji, da naj bi z gojitveni ukrepi, kot je redčenje, zmanjševali SGS (glej poglavje 5.1 tretji odstavek). Na podobne vzorce SGS med različno debelimi skupinami drevja v Vipavskih brdih lahko gledamo tudi v luči ocenjenega raznosa genov. Na podlagi efektivne gostote $D_e = D/10$ je ocenjena velikost soseske 37 dreves sicer relativno majhna, vendar v našem primeru pomeni več kot polovico generativno nastalega sestoja (69 dreves), ob upoštevanju 95% intervala zaupanja pa je v sosesko spolnega razmnoževanja vključenega že več kot $\frac{3}{4}$ sestoja (preglednica 14). Velik pretok genov šibi SGS ter tako otežuje odkrivanje tovrstne strukturiranosti v naravnih populacijah.

Kljub temu, da se je ocena pretoka genov v naši raziskavi pokazala kot močno odvisna od efektivne gostote dreves, na kar je sicer pri uporabi modela treba vedno paziti (Vekemans in Hardy, 2004), dobljeni rezultati potrjujejo izsledke tujih raziskav. Vaughan in sod. (2007a) so velikost soseske v gospodarjenem in negospodarjenem gozdu divje češnje ocenili na 33 oz. 22 dreves, medtem ko je raziskava divje češnje v Nemčiji pokazala na velikost 130 dreves (Schueler in sod., 2006). Podobno oceno razširjanja genov so dobili tudi pri vrsti *Fraxinus excelsior* v Bolgariji (Heuertz in sod., 2001). Znotraj populacij je le–ta znašala med 38 in 66

osebki, medtem ko je na interpopulacijskem nivoju obsegala 126 dreves. Pri vrsti *Chamaecrista fasciculata* (do 0,5 m velika enoletnica iz družine Fabaceae z vzhoda ZDA) so Fenster in sod. (2003) ocenili velikost soseske na povprečno 150 osebkov, razlike med različnimi nivoji proučevanja (subpopulacija, populacija, metapopulacija) pa so bile majhne. S ponovno statistično analizo podatkov izoencimskih raziskav na hrastih (Le Corre in sod., 1998; Streiff in sod., 1999) so Heuertz in sod. (2001) ocenili velikost soseske pri dobu in gradnu na 3.000 do 4.000 dreves oz. na površino 12 – 20 ha. Podatki tako kažejo, da ima divja češnja tako kot druge zgoraj omenjene vrste v primerjavi s hrasti manjšo sposobnost razširjanja genov. O omejenem razširjanju genov pri divji češnji govori tudi podatek, da naj bi se večina semena raznosila v razdalji 50 metrov okoli maternih dreves (Turček, 1968), močno omejeno pa naj bi bilo tudi razširjanje peloda (Vaughan in sod., 2007a). Avtorji navajajo, da naj bi se čebele kot eden glavnih opaševalcev češnje ob obisku že nekaj odraslih, po možnosti sosednjih dreves 'nasitile' ter se vrnilne v gnezdo in tako povzročile, da se geni prenašajo le na krajših razdaljah. Na jakost razširjanja genov vpliva tudi gostota dreves divje češnje v sestoju. Raziskava v Nemčiji je pokazala, da je pretok genov pri divji češnji v redkejših sestojih večji kot v gostejših (Jolivet in sod., 2011). To potrjuje tudi starševska analiza pri rešljiki (*Prunus mahaleb*), kjer se je pokazalo, da drevesa iz manj gostih sestojev prejemajo cvetni prah z večjega števila dreves in tudi na daljših razdaljah kot drevesa, ki rastejo v gostejših sestojih (Garcia in sod., 2005).

Spolšni vzorec prostorsko–genetske strukture (SGS) v sestoju Vipavska brda se prilagaja modelu 'izolacije kot posledice razdalje', kjer je koeficient sorodnosti med bližnjimi drevesi višji in med bolj oddaljenimi nižji, kot bi v sestoju pričakovali (Hardy in Vekemans, 1999; Rousset, 1997, 2000). Ob vključitvi dreves vegetativnega izvora je omenjeni vzorec še posebno izrazit, kar pomeni, da je vegetativno razmnoževanje značilni dejavnik oblikovanja SGS. To potrjuje tudi primerjava intenzitete SGS, izražena s Sp statistiko, ki kaže, da je v Vipavskih brdih prispevek vegetativnega razmnoževanja na SGS velik ter v povprečju znaša 79 % (preglednica 13). Dobljene vrednosti so nekoliko višje, kot jih je pokazala raziskava iz Nemčije (Schueler in sod., 2006), kjer je bil učinek vegetativnega razmnoževanja na SGS 22 %. Tudi neposredna primerjava Sp vrednosti (preglednica 13; Nemčija samo generativno $Sp = 0,009$, skupaj $Sp = 0,012$) kaže, da je intenzivnost SGS v naši populacij 3–krat oz. 12–krat večja. Vrednosti, bolj podobne našim, so dobili Vaughan in sod. (2007a), ki so med drugim ugotovili intenzivnejšo SGS v negospodarjenem gozdu. Tako je ob upoštevanju le generativnega nastanka dreves sestoj Vipavska brda po intenziteti SGS podoben gospodarjenemu gozdu, ob upoštevanju vseh klonskih dreves pa intenziteta SGS celo presega negospodarjeni gozd iz omenjene raziskave. Ob upoštevanju samo generativnih dreves so do podobnih Sp vrednosti prišli tudi Jolivet in sod. (2011), še posebno v sestojih z višjo gostoto divje češnje v sestoju. Med drugim je omenjena raziskava pokazala, da je zaznavanje SGS odvisno tudi od uporabljenih molekularnih markerjev. V redkejših sestojih so se kot najboljši markerji za detekcijo SGS izkazali markerji AFLP, medtem ko so bili v gostejših sestojih najučinkovitejši mikrosateliti.

Kako na SGS, izraženo s Sp statistiko, vplivajo biološke značilnosti posameznih vrst, prikazujeta Vekemans in Hardy (2004). Rastline z izraženo gametofitno nezdružljivostjo in drevesno rastjo imajo značilno nižji SGS kot rastline, sposobne samooplojevanja in zelišča. Nižji SGS naj bi imele tudi rastline, pri katerih semena raznašajo živali in višji SGS, kjer to opravlja veter. Nasprotno je pri opraševanju, kjer naj bi živali povečevale SGS, veter pa naj bi jo zmanjševal. Tri od zgoraj naštetih značilnosti naj bi pri divji češnji tako zmanjševale SGS (gametofitna nezdružljivost, drevesna oblika, zoohorija), medtem ko ga ena povečuje (žužkocvetnost). S povprečno vrednostjo $Sp = 0,031$ populacija divje češnje v Vipavskih brdih močno presega rang velikih ($Sp = 0,010$) in manjših dreves ($Sp = 0,026$) ter presega ostale zoohorne vrste ($Sp = 0,009$). Intenzivnost SGS češnje v Vipavskih brdih je večja tudi od ostalih žužkocvetk ($Sp = 0,017$) in vrst, pri katerih je razvita gametofitna nezdružljivost ($Sp = 0,013$).

5.3.3 Naravne in umetne ovire pri vegetativnem razširjanju divje češnje v sestoju

Pri divji češnji je razmnoževanje s poganjki iz korenin pogost pojav (Russell, 2003; De Cuyper, 2006; Schueler in sod., 2006; Vaughan in sod., 2007a; Jolivet in sod., 2011). Raziskava semenskega sestoja divje češnje v Belgiji je v sestoju 321 dreves odkrila 189 različnih genotipov ter tako potrdila, da je več kot 50 % vseh dreves rastlo v samo 28 klonskih skupinah. V posamezni klonski skupini je bilo med 2 – 42 dreves, kjer je največja razdalja med drevesi iste skupine znašala 37 m (De Cuyper, 2006). Omenjeni rezultati se skoraj povsem ujemajo z rezultati naše raziskave, pri čemer je bila pri nas največja ugotovljena razdalja med drevesi enakega genotipa kar 56 m. Podatkov in raziskav o koreninskem sistemu pri divji češnji je malo. Kutschera in Lichtenegger (2002) pišeta, da naj bi imela divja češnja široko koreninsko razrast in navajata primer iz južne Tirolske, kjer je imelo drevo, ki je raslo na južnem pobočju in rjavih tleh, horizontalni premer koreninskega sistema 24 m. Ker je šlo za meritve enega samega drevesa, je iz njih težko sklepiti o maksimalnih velikostih koreninskega sistema pri divji češnji in s tem povezanih medsebojnih razdaljah med posameznimi odganjki iz enega koreninskega sistema v eni generaciji. Zdi se, da je razdalja 56 m med osebkoma istega klona prevelika za eno generacijo, tj. da bi odgnala iz koreninskega sistema istega osebka, kar do določene mere potrjuje tudi analiza starosti. Kljub analizi le najdebelejših dreves smo namreč znotraj klonskih skupin potrdili velik starostni interval, iz česar lahko sklepamo tudi o več generacijskih klonskih skupinah.

Pri divji češnji je poleg vegetativnega razmnoževanja s poganjki iz korenin po sečnji močno tudi odganjanje iz panjev (Russell, 2003), česar pa na naši raziskovalni ploskvi zaradi 'odsotnosti' sečnje nismo opazili. O vegetativnem razmnoževanju s poganjki iz podrtih oz. poleglih dreves ne poročajo. Omenjenega nismo zasledili niti na naši ploskvi, kjer je bilo čez strugi obeh potokov opaziti veliko podrtih češenj, toda nobenih zakoreninjenih poganjkov. Da je bilo tako tudi v preteklosti, potrjuje genetska analiza, saj dreves istega genotipa, ki bi rastla na različnih bregovih potokov, nismo našli.

Kljub relativno veliki prostorski razsežnosti (priloga B) ostajajo drevesa znotraj klonskih skupin močno prostorsko grupirana (slika 20). K temu so do določene mere pripomogli tudi vodotoki in jarki, ki so se v raziskavi izkazali kot učinkovite naravne prepreke za vegetativno razmnoževanje divje češnje prek koreninskih poganjkov. Zabeležili smo le en primer, ko je drevesom iz iste skupine uspelo premostiti oviro ter se razširiti na drugo stran jarka (glej rdeče kvadratke na sredini slike 20). Nekoliko šibkejšo oviro v smislu vegetativnega širjenja predstavljajo gozdne poti, še posebno, ko gre za manjše in redko uporabljana vlake in kolovoze. Omenjena prehajanja prek ovir pa so se lahko zgodila tudi že pred 50 in več leti, mogoče že pred nastankom poti oz. v času, ko je bil jarek plitvejši ter s tem manj učinkovit pri zaviranju vegetativnega širjenja. Čeprav v raziskavi in nalogi tega nikjer posebej ne proučujemo ali poudarjamo, se zavedamo, da je rast in razrast korenin ter posledično vegetativno širjenje prek koreninskih odganjkov močno odvisno od fizikalnih, kemijskih in bioloških lastnosti tal (glej Kutschera in Lichtenegger, 2002), zaradi česar bi bilo potrebno izsledke naše raziskave preveriti tudi na drugačnih rastiščih z drugimi drevesnimi vrstami, predvsem pa z drugače zasnovano in usmerjeno raziskavo.

5.3.4 Somatske mutacije

O somatskih mutacijah na vinski trti (*Vitis* sp.), ki naj bi bile znotraj omenjenega rodu razmeroma pogoste, poroča Pelsy (2010). Najpogostejše mutacije, ki jih omenja, so točkovne mutacije, daljše delecije, variacije v številu tandemskih ponovitev na mikrosatelitskih lokusih in transpozicija (retrotranspozoni). Le-te se dogajajo tako na selektivno nevtralnih kot na kodirajočih odsekih DNA. Slednje so podlaga tudi za razlikovanje nekaterih gojenih sort trte. Omenjene mutacije se večinoma ne izrazijo na celotnih rastlinah, temveč le znotraj posamezne plasti celic, zaradi česar nastanejo himere. Zaradi občasnih celičnih prerazporeditev v himerah pa lahko pride tudi do homogenizacije genotipa znotraj celotne rastline. Gonilni dejavniki 'klonske evolucije', ki jih navaja Pelsy (2010), so i) starost klena (dlje časa kot se klon vegetativno razmnožuje, dlje časa je podvržen stresu in več mutacij se akumulira), ii) različne okoljske obremenitve zaradi stresa, iii) ne izključuje pa tudi možnosti, da so nekateri genotipi bolj dovetni za mutacije kot drugi.

Mikrosatelitski markerji spadajo med najbolj variabilne sekvene genomske DNA. Visok polimorfizem izhaja iz variabilnosti v številu tandemskih ponovitev, kar se odrazi v skupni dolžini alela. Najpogostejši vzrok mutacij na mikrosatelitskih lokusih je zdrs polimeraze med podvojevanjem DNA (Eisen, 1999). Pri divji češnji, ki se pogosto razmnožuje vegetativno, bi do tovrstnih mutacij med drugim lahko prihajalo v zgodnji fazi razvoja meristema, ko nova rastlina požene iz nadomestnih brstov na koreninah. Obstaja velika verjetnost, da smo na omenjeni pojav naleteli v sestoju Vipavska brda. Z analizo osmih mikrosatelitskih lokusov smo namreč ugotovili, da se nekateri osebki med seboj razlikujejo le na enem izmed osmih lokusov (preglednica 15). Verjetnost, da bi imeli dve naključno izbrani drevesi, pri katerih upoštevamo tudi sorodstvena razmerja (konzervativen izračun, *enacba* 2) enak genotip na

sedmih lokusih, na enem pa ne, je med $2,5 \times 10^{-3}$ in $2,9 \times 10^{-3}$ (odvisno, na katerem lokusu so razlike).

Na lokusih EMPa004 in EMPa005 so se podskupine razlikovale od izvorne za eno tandemsko ponovitev (2 bp) (preglednica 15). V primeru insercije na lokusu EMPa004 je nastal novi alel dolžine 196 bp, ki v sestoj do sedaj še ni obstajal, medtem ko je z delecijo nastal alel dolžine 182 bp, ki pa je v vzorcu obstajal, vendar je bil razmeroma redek. V primeru lokusa EMPa005 je z delecijo nastal alel dolžine 245 bp, ki ga v vzorcu do sedaj še ni bilo. Nekoliko vprašljiv je obstoj mutacije na lokusu EMPaS12, kjer naj bi bil novi alel v primerjavi z izvornim daljši za 7 bp (da smo izključili napako, smo analizo na lokusu in obravnavanih osebkih ponovili trikrat). Ponavljači se motiv na omenjenem lokusu je kompleksen (preglednica 1), kar bi pri mutaciji lahko vplivalo na dolžino novonastalega alela (Ellegren, 2004). Ne gre pa tudi spregledati, da je izvorni genotip na obravnavanem lokusu homozigoten (138 bp). To bi bila lahko posledica dominance pomnoževanja kratkega alela, kar vodi k izpadu dolgega alela (Wattier in sod., 1998). Še zanimivejše je stanje na lokusih EMPa015 in UDP98-412, kjer so drevesa mutirala celo na obeh alelih na lokusu. V vseh primerih gre za mutacije tipa delecija. Na lokusu EMPa015 je prišlo na krajšem alelu na lokusu do delecije ene tandemsko ponovitve (2 bp), na daljšem alelu pa so razlike med izvornimi in novonastalimi aleli 3 oz. 5 bp. Na novo nastali alel dolžine 223 bp je v sestoj razmeroma pogost, medtem ko alela 251 bp v sestoj do sedaj še ni bilo. Na lokusu UDP98-412 je novi alel 113 bp v sestoj redek (zabeležen samo še na enem drevesu znotraj sestaja), medtem ko je alel 117 bp na obravnavanem lokusu najpogosteji. Mutacije obeh alelov na posameznem lokusu so potrdili tudi pri vrsti *Robinia pseudoacacia* (Lian in sod., 2004), vendar velja poudariti, da je pojav zelo redek. Kljub visoki mutabilnosti mikrosatelitskih lokusov, ocena pogostosti znaša med 10^{-2} in 10^{-6} mutacij na lokus na generacijo (Li in sod., 2002), je namreč verjetnost, da pride do mutacij obeh alelov znotraj istega lokusa zelo majhna. Izhajajoč iz ocene pogostosti mutacij bi po verjetnostnem računu znašala med 10^{-4} in 10^{-12} , kar pa je le groba ocena, saj je hitrost spreminjanja posameznih mikrosatelitskih lokusih različno hitra, prav tako pa nanjo vplivajo številni dejavniki (Ellegren, 2004). V vseh zgornjih primerih gre najverjetneje za somatske mutacije, ki so se zgodile v procesu vegetativnega razmnoževanja, kar lahko vodi k precenjevanju celotne genetske variabilnosti. V kolikor posamezna drevesa oz. podskupine vključimo v skupino izvornega klena, se povprečno število dreves skupini iz 6,1 poveča na 6,7, sama velikost površine, ki jo skupina porašča, pa ostaja ista, saj so na novo vključena drevesa v večini primerov znotraj območja izvorne klonske skupine (slika 20). O somatskih mutacijah pri divji češnji poročajo že Vaughan in sod. (2007b). V raziskavi so odkrili skupine dreves, ki so se med seboj razlikovale na enem od 13 analiziranih lokusov. Tako so potrdili mutacije na lokusih EMPaS06, EMPaS14, EMPa018, PceGA34 ter enako kot mi tudi na lokusih EMPa004 in EMPa015. V vseh primerih je prišlo do mutacije na enem alelu na lokusu, medtem ko smo v naši raziskavi potrdili tudi tri primere mutacij na obeh alelih na lokusu. Vaughan in sod. (2011b) so v raziskavi analizirali tudi S–lokuse, kjer pa mutacij niso odkrili (gametofitna nezdružljivost med izvornimi in mutiranimi drevesi ostaja 'neskrhana'). Pri robiniji (*Robinia pseudoacacia*) so Lian in sod. (2004) med drugim ugotovili, da imajo

daljši aleli tendenco mutiranja v krajše alele, kar naj bi preprečevalo neskončno 'rast' mikrosatelitov. To potrjujejo tudi rezultati naše raziskave, kjer so bile mutacije na 'krajših' lokusih oboje–smerne (delecije in insercije), medtem ko je prišlo na 'daljših' lokusih EMPa005 in EMPa015 v vseh primerih do krajšanja alelov. Podoben vzorec mutiranja so pokazali tudi mikrosateliti v britanski raziskavi (Vaughan in sod., 2007b). Z upoštevanjem vseh 217 dreves (vegetativni + generativni izvor) v sestoju Vipavska brda znaša heterozigotnost $H_O = 0,757$, kar je le rahlo več kot, če upoštevamo le osebke generativnega izvora (62 dreves^h) $H_O = 0,738$. Rezultati kažejo, da somatske mutacije v procesu vegetativnega razmnoževanja nekoliko povečujejo heterozigotnost, kar potrjujejo tudi že Vaughan in sod. (2007b).

^h Do sedaj smo generativni nastanek dreves enačili z unikatnim genotipom (69 unikatnih genotipov = 69 generativno nastalih dreves). V primeru prikaza učinka mutacij na heterozigotnost pa smo število generativnih dreves zmanjšali za število genotipov (tj. 7), ki so nastali zaradi somatskih mutacij in ne zaradi spolnega razmnoževanja.

6 SKLEPI

V ciljih naloge smo si postavili sedem delovnih hipotez, na katere smo v nalogi skušali najti ustreerne odgovore.

1) Pri divji češnji obstaja velika genetska variabilnost znotraj njenih sestojev in majhna variabilnost med sestoji

Analiza 312 dreves divje češnje iz štirih semenskih objektov, ki hkrati predstavljajo tudi naravne populacije divje češnje v Sloveniji, s pomočjo osmih mikrosatelitskih markerjev je pokazala, da je vzorec genetske variabilnosti pri divji češnji podoben vzorcu, ki je značilen za dolgo živeče in tuje prašne drevesne vrste. Analizirani sestoji divje češnje v Sloveniji kažejo veliko genetsko variabilnost ($H_E = 0,726$), nizko stopnjo razmnoževanja v sorodstvu ($F_{IS} = -0,029$) in majhno med-populacijsko razlikovanje ($F_{ST} = 0,040$; $G'_{ST} = 0,137$). Majhne genetske razlike med populacijami dopuščajo možnost oblikovanja manjšega števila semenskih objektov. Pri njihovem izločanju moramo paziti na ustrezeno genetsko variabilnost in majhno sorodno povezanost med drevesi. Razdalja med drevesi, iz katerih nabiramo seme, naj znaša vsaj 100 m.

2) Genetske razlike med geografsko bližjimi sestoji so manjše od razlik med bolj oddaljenimi sestoji

V splošnem lahko rečemo, da so genetske razlike med sestoji majhne in v vseh parnih primerjavah enakega velikostnega razreda. Kot najmanjše so se pokazale razlike med sestojema Ilirska Bistrica in Vipavska brda, ki sta si med vsemi štirimi sestoji tudi geografsko najbližja ter hkrati pripadata isti, submediteranski ekološki regiji. Največje genetske razlike smo potrdili med sestojema Vipavska brda in Vrhnik, ki sta oddaljeni le malo več kot prvi omenjeni, medtem ko so razlike med sestojem Zavrč in drugimi tremi manjše. Eden od razlogov za nejasne geografsko pogojene genetske razlike je velika znotraj sestojna in majhna med sestojna variabilnost, ki je posledica velikega pretoka genov.

3) Trenutna izbira semenskih objektov za divjo češnjo ne omogoča redne preskrbe z reprodukcijskim materialom ustrezone kakovosti

Na podlagi genetske analize štirih od devetih registriranih semenskih objektov divje češnje v Sloveniji lahko izrazimo zadržek glede omogočanja preskrbe z njenim kakovostnim reprodukcijskim materialom. Visok delež dreves vegetativnega nastanka v semenskem sestolu Vipavska brda ne omogoča zagotavljanja kakovostnega gozdnega reprodukcijskega materiala (GRM), zato predlagamo, da se sestoj izloči iz seznama registriranih semenskih objektov. Kakovost GRM je vprašljiva tudi v semenskih objektih Ilirska Bistrica in Vrhnika, ki sta nastala z naravnim zaraščanjem večjih površin v bližnji preteklosti. Domnevamo, da sta bila oba semenska objekta registrirana zaradi primernosti za nabiranje semen in pomanjkanja semenskih objektov divje češnje v Sloveniji in ne zaradi svoje kvalitete in 'superiornosti'. Edini od štirih analiziranih objektov, ki s stališča genetske variabilnosti in na terenu opažene fenotipske superiornosti dreves zagotavlja kakovosten GRM, je semenski sestoj Zavrč. V

Seznamu gozdnih semenskih objektov je omenjeni sestoj povsem upravičeno predlagan za genski rezervat.

4) Kot posledica vegetativnega razmnoževanja se v sestoju Vipavska brda pojavljajo skupine klonov

V sestoju Vipavska brda smo med 217 analiziranimi drevesi odkrili 177 takšnih, ki so imela identičen multilokusni genotip kot vsaj še en osebek v sestoju. Zaradi zelo majhne verjetnosti, da bi imeli dve naključno izbrani drevesi v sestoju identičen 8-lokusni genotip sklepamo, da gre v omenjenih primerih za klone dreves, ki so nastali z vegetativnim odganjanjem iz korenin. Drugih vrst vegetativnega razmnoževanja, kot sta odganjanje iz panjev ali odganjanje iz poleglih debel, v sestoju nismo zasledili. Število dreves v posameznih klonskih skupinah se je gibalo med 2 in 21 drevesi (povprečno 6 dreves na genotip).

5) Vegetativno razmnoževanje vpliva na genetsko variabilnost in prostorsko–genetsko strukturo sestoja Vipavska brda

Več kot 68 % dreves v sestoju Vipavska brda je vegetativnega nastanka. Posledica prostorske bližine identičnih genotipov je njihova nenaključna razporeditev v prostoru, kar vodi v značilno prostorsko–genetsko strukturo. Ob upoštevanju tako generativnega kot vegetativnega nastanka dreves je intenziteta prostorsko–genetske strukture sestoja velika ($Sp = 0,149$) in presega intenziteto prostorsko–genetske strukture divje češnje v tujih raziskavah. Ob izključitvi dreves vegetativnega nastanka je intenziteta prostorsko–genetske strukture sicer 5–krat manjša, vendar še vedno večja, kot je v splošnem značilno za vetrocvetne drevesne vrste, pri katerih je razvita gametofitna nezdružljivost in katerih semena se raznašajo s pomočjo živali.

Kljub drugačnim pričakovanjem pa je analiza pokazala, da se preko vegetativnega razmnoževanja genetska variabilnost v sestoju lahko tudi povečuje. V sestoju Vipavska brda smo odkrili redke somatske mutacije, pri katerih so med drugim nastali tudi čisto novi aleli, tj. aleli, ki jih v sestoju do sedaj še ni bilo. Ker so mutacije nasploh redke, praviloma prihaja do sprememb le na enem alelu na določenem lokusu. To se je v večini primerov pokazalo tudi v sestoju Vipavska brda, kar je rahlo zvišalo njegovo heterozigotnost. Kljub teoretično majhni verjetnosti pa smo v omenjenem sestoju identificirali tudi mutacije, pri katerih je prišlo do sprememb obeh alelov znotraj lokusa.

6) Gozdne poti, potoki in jarki preprečujejo vegetativno širjenje divje češnje v sestoju

Prostorsko–genetska analiza je pokazala, da so drevesa znotraj posameznih klonskih skupin močno prostorsko grupirana. Povprečna razdalja med drevesi znotraj klona je bila v intervalu od 2,7 m do 21,6 m, medtem ko je znašala maksimalna razdalja med dvema drevesoma istega klona 55,7 m. To je nekoliko več, kot je bilo pri divji češnji znano do sedaj. V analizi smo ugotovili, da k prostorski 'grupaciji' posameznih klonov pripomorejo tudi gozdne poti, potoki in jarki, ki predstavljajo ovire razrasti korenin ter na ta način ovirajo vegetativno razmnoževanje ob pomoči odganjkov iz korenin. Na podlagi genetske analize in natančnih

lokacij objektov (dreves, ovir) lahko v primeru divje češnje trdimo, da je potok v gozdu ovira, ki preprečuje vegetativno širjenje vrste, medtem ko jo gozdne poti in jarki le otežujejo.

7) Starostna in debelinska sestava ter genetska variabilnost kažejo enake vzorce prostorske strukturiranosti v sestoju Vipavska brda

Analiza je pokazala, da je stopnja povezanosti med debelino in starostjo dreves divje češnje v sestoju Vipavska brda nizka. Glavni razlog za to je odsotnost nege oziroma pomanjkljivo izvajanje nege sestoja. Tako prostorsko-debelinska kot prostorsko-genetska analiza sta pokazali, da so si prostorsko bližja drevesa bolj podobna tudi po debelini oz. genetskem zapisu. Podobnost, večjo od pričakovane, je zaslediti do oddaljenosti 40 m med drevesi.

7 POVZETEK

Slovensko gozdarstvo temelji na načelih trajnosti, mnogonamenskosti in sonaravnosti. Dolga življenjska doba dreves narekuje gospodarjenje z gozdom in gozdnogojitvene ukrepe, ki zagotavljajo rastiščem genetsko pestre in ekološko ter fiziološko prilagojene populacije gozdnega drevja v posameznih ekosistemih. Čeprav ima umetna obnova gozdov v primerjavi z naravno v Sloveniji majhen delež, pa lahko z njo bistveno močneje vplivamo na drevesno sestavo, genetski dobiček pa tudi na genetsko strukturo obnovljenih sestojev. Tako evropske smernice kot slovenska zakonodaja pri umetni obnovi oziroma na področju pridelovanja, trženja in uporabe gozdnega reproduksijskega materiala (GRM) določajo in spodbujajo uporabo GRM lokalnega izvora oziroma zahtevajo uporabo visoko kvalitetnega GRM, ki je genetsko in fenotipsko primeren rastišču.

Divja češnja (*Prunus avium* L.) je vrsta, ki pripada skupini plemenitih listavcev in je kot tako predmet številnih raziskav v evropskem prostoru. Namreč, kot hitro rastoča vrsta, z močno poudarjeno apikalno rastjo, razmeroma kratko življenjsko dobo in visoko vrednim in priljubljenim lesom poseblja željo po pospeševanju in povečevanju njenega deleža v gozdovih. Kot vrsta z obveznim navzkrižnim oprševanjem si s pomočjo spolnega razmnoževanja zagotavlja veliko genetsko variabilnost, vendar pa je tudi vrsta, ki se z odganjanjem iz korenin razmnožuje vegetativno, kar vodi k zmanjševanju njene pestrosti.

Divja češnja je v Sloveniji avtohtonata vrsta, ki se v sestojih pojavlja v posamični primesi ali manjših skupinah. Zaradi njenega velikega gospodarskega in ekološkega potenciala bi bilo smotrno njen delež v slovenskih gozdovih povečati. Večanje njenega deleža z umetno obnovo pomeni sadnjo, sadik vzgojenih iz visokokvalitetnega semena, nabranega v ustreznih semenskih objektih.

Z raziskavo smo želeli ugotoviti, kakšna je genetska struktura in variabilnost divje češnje v semenskih objektih v Sloveniji, kaj vpliva na genetsko sestavo sestojev ter oceniti primernost in sposobnost semenskih objektov za zagotavljanje redne preskrbe z reproduksijskim materialom ustrezne kakovosti. Poznavanje genetske variabilnosti je namreč pomemben temelj uspešnega in spreminjačočim se razmeram prilagojenega gojenja in učinkovitega ohranjanja genofonda vrste.

Analize, ki bi potrdile ali ovrgle raziskovalne hipoteze smo izvajali na štirih raziskovalnih ploskvah v izbranih, registriranih semenskih objektih, ki so hkrati predstavljale tudi naravne populacije divje češnje v Sloveniji. Za potrebe genetske analize smo v sestojih Ilirska Bistrica, Vrhnika in Zavrč nabrali vzorce iz vsaj 30-tih dreves, medsebojno oddaljenih vsaj 30 metrov, medtem ko smo v sestoju Vipavska brda v vzorec vključili vsa drevesa nad 5 cm prsnega premera. Vzorec posameznega drevesa je predstavljal list iz krošnje ali kambij iz korenčnika drevesa. Le-te smo do izolacije DNA položili na silikagel. Vsem drevesom v vzorcu (skupno 312 dreves) smo s pomočjo naprave GPS natančno določili prostorske koordinate, drevesom v

Vipavskih brdih pa smo izmerili tudi prsni premer ter določenim odvzeli tudi izvrte debla za ugotavljanje njihove starosti. Izolacijo DNA smo izvedli s Qiagenovim kompletom, medtem ko smo genotipizacijo DNA opravili s pomočjo devetih jedrnih mikrosatelitskih markerjev (EMPaS2, EMPa004, EMPa005, EMPaS6, EMPaS12, EMPaS14, EMPa015, UDP98-412 in PceGA34). PCR produkte smo analizirali s pomočjo kapilarne elektroforeze na avtomatskem sekvenatorju ABI3130XL.

S pomočjo jedrnih mikrosatelitov smo proučili genetsko pestrost in raznolikost semenskih objektov ter ocenili število razmnoževalno uspešnih migrantov na generacijo. Odnose med genetskimi in prostorskimi razdaljami smo podrobnejše proučili s prostorsko avtokorelacijo in pomočjo kazalnika 'izoliranost z razdaljo'. Razlike med genetsko in debelinsko strukturo sestojata smo primerjali z Mantelovim testom.

Ugotovili smo, da je vzorec genetske variabilnosti pri divji češnji podoben vzorcu, ki je značilen za dolgo živeče in tuje prašne drevesne vrste. Analizirani sestoji divje češnje v Sloveniji kažejo veliko genetsko variabilnost ($H_E = 0,726$), nizko stopnjo razmnoževanja v sorodstvu ($F_{IS} = -0,029$) in majhno med-populacijsko razlikovanje ($F_{ST} = 0,040$; $G'_{ST} = 0,137$). Kot najmanjše so se pokazale razlike med sestojema Ilirska Bistrica in Vipavska brda, ki sta si med vsemi štirimi sestoji tudi geografsko najbližja ter hkrati pripadata isti, submediteranski ekološki regiji. Največje genetske razlike smo potrdili med sestojema Vipavska brda in Vrhnika, ki sta oddaljeni le malo več kot prvi omenjeni, medtem ko so razlike med sestojem Zavrč in drugimi tremi manjše. Najverjetnejši razlog za nejasne geografsko pogojene genetske razlike je velika znotraj sestojna in majhna med sestojna variabilnost, ki je posledica velikega pretoka genov. V sestolu Vipavska brda smo odkrili redke somatske mutacije, pri katerih so med drugim nastali tudi čisto novi aleli, tj. aleli, ki jih v sestolu do sedaj še ni bilo. Ker so mutacije naspoloh redke, praviloma prihaja do sprememb le na enem alelu na določenem lokusu. To se je v večini primerov pokazalo tudi v sestolu Vipavska brda, kar je rahlo zvišalo sestojno heterozigotnost. Kljub teoretično majhni verjetnosti pa smo v omenjenem sestolu identificirali tudi mutacije, pri katerih je prišlo do sprememb obeh alelov znotraj lokusa.

V sestolu Vipavska brda smo med 217 analiziranimi drevesi odkrili 177 takšnih, ki so imela identičen multilokusni genotip kot vsaj še en osebek v sestolu, kar pomeni, da je več kot 68 % dreves v sestolu vegetativnega nastanka. Posledica prostorske bližine identičnih genotipov je njihova nenaključna razporeditev v prostoru, kar vodi v značilno prostorsko-genetsko strukturo. Ob upoštevanju tako generativnega kot vegetativnega nastanka dreves je intenziteta prostorsko-genetske strukture sestola Vipavska brda velika ($Sp = 0,149$) in presega intenziteto prostorsko-genetske strukture divje češnje v tujih raziskavah. Ob izključitvi dreves vegetativnega nastanka je intenziteta prostorsko-genetske strukture v Vipavskih brdih sicer 5-krat manjša ($Sp = 0,031$), vendar še vedno večja, kot je v splošnem značilno za vetrocvetne drevesne vrste, pri katerih je razvita gametofitna nezdružljivost in katerih semena se raznašajo s pomočjo živali.

Prostorska–genetska analiza v Vipavskih brdih je pokazala, da so drevesa znotraj posameznih klonskih skupin močno prostorsko grupirana. Povprečna razdalja med drevesi znotraj klena se giblje v intervalu od 2,7 m do 21,6 m, medtem ko znaša maksimalna razdalja med dvema drevesoma istega klena 55,7 m. To je nekoliko več, kot je bilo pri divji češnji znano do sedaj. V analizi smo ugotovili, da k prostorski 'grupaciji' posameznih klonov v Vipavskih brdih pripomorejo tudi gozdne poti, potoki in jarki, ki predstavljajo ovire razrasti korenin ter na ta način ovirajo vegetativno razmnoževanje ob pomoči odganjkov iz korenin. Na podlagi genetske analize in natančnih lokacij objektov (dreves, ovir) lahko v primeru divje češnje v Vipavskih brdih trdimo, da je potok v gozdu ovira, ki preprečuje vegetativno širjenje vrste, medtem ko jo gozdne poti in jarki le otežujejo.

Debelina in starost dreves divje češnje v sestoju Vipavska brda kažeta nizko stopnjo korelacije, kar pripisujemo pomanjkljivemu izvajanju nege v sestoju. Prostorska analiza je pokazala, da so si prostorsko bližja drevesa podobna tako po genetskem zapisu kot po debelini. Omenjena podobnost je večja od pričakovane do oddaljenosti 40 m med drevesi.

Na podlagi genetske analize štirih od devetih registriranih semenskih objektov divje češnje v Sloveniji lahko izrazimo zadržek glede omogočanja preskrbe z njenim kakovostnim reproduksijskim materialom. Visok delež dreves vegetativnega nastanka v semenskem sestoju Vipavska brda ne omogoča zagotavljanja kakovostnega gozdnega reproduksijskega materiala (GRM), zato predlagamo, da se sestoj izloči iz seznama registriranih semenskih objektov. Kakovost GRM je vprašljiva tudi v semenskih objektih Ilirska Bistrica in Vrhnika, ki sta nastala z naravnim zaraščanjem večjih površin v bližnji preteklosti. Domnevamo, da sta bila oba semenska objekta registrirana zaradi primernosti za nabiranje semen in pomanjkanja semenskih objektov divje češnje v Sloveniji in ne zaradi svoje kvalitete in 'superiornosti'. Edini od štirih analiziranih objektov, ki s stališča genetske variabilnosti in na terenu opažene fenotipske superiornosti dreves zagotavlja kakovosten GRM, je semenski sestoj Zavrč. V Seznamu gozdnih semenskih objektov je omenjeni sestoj povsem upravičeno predlagan za genski rezervat.

8 SUMMARY

Slovenian forestry operates on the principles of sustainable and multipurpose management. Management and tending measures are dictated by the longevity of forest trees; in Slovenia they are adapted as much as possible to site-specific ecological, physiological and genetic characteristics of trees in the respective forest ecosystems. Although artificial regeneration of forests accounts for a small share of regeneration relative to natural regeneration, it can have a significantly bigger effect on tree composition, genetic gain and the genetic structure of regenerated stands. European guidelines as well as Slovenian legislation on artificial regeneration, i.e. the production, sale and use of forest reproductive material (FRM), require and promote the use of locally sourced, high-quality FRM that is genetically and phenotypically adapted to site conditions.

Wild cherry (*Prunus avium* L.) is a valuable broadleaved species and as such the subject of extensive research in Europe. As a fast growing species with strong apical dominance, relatively short production period, and highly valuable and desirable wood, increasing its share in forests is strongly promoted. As a species with a self-incompatibility system, it ensures genetic variability with generative reproduction, but it also propagates vegetatively via root suckers, which reduces its genetic variability.

Prunus avium is indigenous to Slovenia and appears in stands individually or in smaller groups. Given its economic and ecological potential, it would be sensible to increase its share in Slovenian forests, which requires planting seedlings grown from high-quality seeds collected in appropriate seed stands.

We conducted the study to determine the genetic structure and variability of *Prunus avium* in seed stands in Slovenia and the effects on the genetic composition of stands, and to evaluate the suitability of seed stands for the regular supply of reproductive material of appropriate quality. Determining genetic variability is a crucial precondition for sustainable forest management and effective preservation of the gene pool of the species adjusted to the changing environments.

Analyses to confirm or reject the research hypothesis were conducted on four sample plots in selected registered seed stands (Vipavska brda, Ilirska Bistrica, Vrhnika and Zavrč), which also represent natural populations of *Prunus avium* in Slovenia. For the purposes of genetic analysis, we collected samples of at least 30 trees in Ilirska Bistrica, Vrhnika and Zavrč (trees were randomly chosen and at least 30 m apart), while all trees with d.b.h. of over 5 cm were included in the sample in Vipavska brda. Leaves from the canopy or cambium from the tree base was used as samples. Young leaves or cambium from each tree were collected and put directly on silica gel until DNA extraction. All trees in the sample (312 in total) were precisely geolocated using GPS. The trees in Vipavska brda were also measured at d.b.h. and individual cores were collected to determine tree age. DNA isolation was conducted with a

Qiagen set and genotypization was conducted with nine nuclear microsatellite markers (EMPaS2, EMPa004, EMPa005, EMPaS6, EMPaS12, EMPaS14, EMPa015, UDP98-412 and PceGA34). PCR products were analysed with automated capillary electrophoresis on a DNA sequencer.

With the help of nuclear microsatellites we studied the genetic variability and differentiation within and between seed stands and estimated the number of reproductively successful migrants per generation. Relations between genetic and spatial distances were studied in depth with spatial autocorrelation and with the help of the indicator 'isolation by distance'. Differences between genetic and d.b.h. structure of the stand were compared with the Mantel test.

We found that the sample of genetic variability of *Prunus avium* is similar to the pattern characteristic of longevoous and outcrossing tree species. The analyzed stands of *Prunus avium* in Slovenia indicate significant genetic variability ($H_E = 0,726$), low degree of inbreeding ($F_{IS} = -0,029$) and low intra-population differentiation ($F_{ST} = 0,040$; $G'_{ST} = 0,137$). The smallest differences were between the stands Ilirska Bistrica and Vipavska brda, which are geographically closest among the four stands and belong to the same Submediterranean ecological region. The stands Vipavska brda and Vrhnika displayed the biggest genetic differences, though not significantly farther apart geographically than Vipavska brda and Ilirska Bistrica. The differences between Zavrc and the other three stands are smaller. The most likely cause of the unclear geographically determined genetic differences is high intra-stand and low inter-stand variability, which is a consequence of significant gene flow. In the Vipavska brda stand we discovered rare somatic mutations that *inter alia* produced completely new alleles, which had previously not been present in the stand. Since mutations are rare in general, changes typically occur on only one allele in a locus. This was evident in the majority of samples in the Vipavska brda stand, which slightly elevated the stand heterozygosity. Despite the theoretically low probability, we also identified mutations where both alleles in a single locus were changed.

In 217 analyzed trees in Vipavska brda we discovered 177 that have an identical multilocus genotype as at least one other tree in the stand, which means that over 68% of the trees in the stand are of vegetative origin. The consequence of the spatial proximity of identical genotypes is non-random spatial distribution, which results in a characteristic spatial–genetic structure (SGS). Accounting for both generative and vegetative origin of trees, the intensity of the SGS structure of the Vipavska brda stand is significant ($Sp = 0,149$) and exceeds the SGS intensity of *Prunus avium* in foreign studies. Including only one representative per clone group, SGS intensity is 5-times lower in Vipavska brda ($Sp = 0,031$), but it is still higher than in general for anemophilous species with developed self-incompatibility systems whose seeds are disseminated with the help of animals.

SGS analysis in Vipavska brda showed that trees within individual clone groups are strongly spatially grouped. The average distance between trees in a clone group is between 2,7 and 21,6 m, while the maximum distance between two trees in a clone group was 55,7 m, slightly more than previously recorded for *Prunus avium*. We determined that the spatial grouping of clones in Vipavska brda is also affected by forest paths, streams and ditches, which represent obstacles to root growth and consequently obstruct vegetative propagation via root suckers. Based on the genetic analysis and precise location of objects (trees, obstacles) we can posit for *Prunus avium* in Vipavska brda that streams in forest represent obstacles that prevent vegetative expansion of the species whereas forest paths and ditches merely obstruct it.

Diameter and age of *Prunus avium* in the Vipavska brda stand indicate a low degree of correlation, which we attribute to insufficient stand tending measures. Spatial analysis shows that spatially proximate trees are similar both in terms of genetic record and diameter. This similarity is higher than expected up to a distance between trees of 40 m.

Based on genetic analysis of four out of nine registered official *Prunus avium* seed stands in Slovenia, we are reserved about their potential for the provision of quality forest reproductive material (FRM). The high share of trees of vegetative origin in Vipavska brda precludes the provision of quality FRM. We therefore propose that the stand be excluded from the list of registered seed stands. FRM quality is also questionable in the seed stands Ilirska Bistrica and Vrhnika, which are the result of natural reforestation that recently occurred in a large open area. We assume that both seed stands were registered due to their suitability for seed collection and the general lack of *Prunus avium* seed stands in Slovenia, not their quality and 'superiority'. Zavrč is the only of the four analyzed seed stands that provides quality FRM in terms of genetic variability and phenotypical characteristics of trees that were observed in the field were also superior. In the Register of Forest Seed Stands the said stand is entirely justified proposed as a gene reserve.

9 VIRI

- A dictionary of biology. 2000. 4. Ed. Oxford, Oxford University Press: 641 str.
- Avramidou E., Ganopoulos I. V., Aravanopoulos F. A. 2010. DNA fingerprinting of elite Greek wild cherry (*Prunus avium* L.) genotypes using microsatellite markers. *Forestry*, 83: 527-533.
- Asuka Y., Tomaru N., Nisimura N., Tsumura Y., Yamamoto S. 2004. Heterogeneous genetic structure in a *Fagus crenata* population in an old-growth beech forest revealed by microsatellite markers. *Molecular ecology*, 13: 1241-1250.
- Ballian D., Bogunić F., Čebaravdić A., Pekeč S., Franjić J. 2012. Population differentiation in the wild cherry (*Prunus avium* L.) in Bosnia and Herzegovina. *Periodicum biologorum*, 114: 43-54.
- Barton N. H., Slatkin M. 1986. A quasi-equilibrium theory of the distribution of rare alleles in a subdivided population. *Heredity*, 56: 409-415.
- Bošković R., Tobutt K. R. 2001. Genotyping cherry cultivars assigned to incompatibility groups, by analysing stylar ribonucleases. *Theoretical and applied genetics*, 103: 475-485.
- Božič G., Brus R., Breznikar A., Kump B. 2000. Prikaz sodobnih raziskovalnih metod in raziskav v gozdni populacijski genetiki. *Gozdarski vestnik*, 58: 361-369.
- Brus R. 2008. Dendrologija za gozdarje. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 408 str.
- Brus R., Jarni K., Kraigher H. 2010. Tehnične smernice za ohranjanje in rabo genskih virov: divja češnja (*Prunus avium*) Slovenija. *Gozdarski vestnik*, 68: 375-378.
- Callen D. F., Thompson A. D., Shen Y., Phillips H. A., Richards R. I., Mulley J. C., Sutherland G. R. 1993. Incidence and origin of null alleles in the (AC) microsatellite markers. *American journal of human genetics*, 52: 922-927.
- Clarke J. B., Tobutt K. R. 2003. Development and characterization of polymorphic microsatellites from *Prunus avium* 'Napoleon'. *Molecular ecology notes*, 3: 578-580.
- Clarke J. B., Tobutt K. R. 2009. A standard set of accessions, microsatellites and genotypes for harmonising the fingerprinting of cherry collections for the ECPRG. *Acta Horticulturae*, 814: 615-618.
- Clarke J. B., Sargent D. J., Bošković R. I., Belaj A., Tobutt K. R. 2009. A cherry map from the inter-specific cross *Prunus avium* 'Napoleon' × *P. nipponica* based on microsatellite, gene-specific and isoenzyme markers. *Tree genetics & genomes*, 5: 41-51.
- Council Directive 1999/105/EC of 22 December 1999 on the marketing of forest reproductive material. *Official Journal of the European Communities*, 11: 17-40.
- De Cuyper B., Sonneveld T., Tobutt K. R. 2005. Determining self-incompatibility genotypes in Belgian wild cherries. *Molecular ecology*, 14: 945-955.
- De Cuyper B. 2006. Selection and breeding of wild cherry in Flanders: towards a new generation of clonal seed orchards. V: COST E42, Workshop on Genetics, 18.-22.4.2006, Leuven, Belgium: presentations and abstracts: 1-27.

- Derory J., Mariette S., Gonzalés-Martínez S. C., Chagné D., Madur D., Gerber S., Brach J., Persyn F., Ribeiro M. M., Plomion C. 2002. What can nuclear microsatellites tell us about maritime pine genetic resources conservation and provenance certification strategies? *Annales of forest science*, 59: 699–708.
- Downey S. L., Iezzoni A. F. 2000. Polymorphic DNA markers in black cherry (*Prunus serotina*) are identified using sequences from sweet cherry, peach, and sour cherry. *Journal of the American society for horticultural science*, 125: 76-80.
- Ducci F., Santi F. 1997. The distribution of clones in managed and unmanaged populations of wild cherry (*Prunus avium*). *Canadian journal of forest research*, 27: 1998-2004.
- Eisen J. A. 1999. Mechanistic basis for microsatellite instability. V: Microsatellites. Evolution and applications. Golstein D. B., Schlötterer C. (ur.). Oxford, Oxford University Press: 34-48.
- Ellegren H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Genetics*, 5: 435-445.
- EUFORGEN 2009. Distribution map of Wild cherry (*Prunus avium*).
www.euforgen.org, (09.04.2013).
- Excoffier L., Laval G., Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics online*, 1: 47-50.
- Fenster C. B., Vekemans X., Hardy O. J. 2003. Quantifying gene flow from spatial genetic structure data in a metapopulation of *Chamaecrista fasciculata* (Leguminosae). *Evolution*, 57: 995-1007.
- Frascaria N., Santi F., Gouyon P. H. 1993. Genetic differentiation within and among populations of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) and wild cherry (*Prunus avium* L.). *Heredity*, 70: 634-641.
- Fraxigen: ash species in Europe: biological characteristics and practical guidelines for sustainable use. 2005. Oxford, Oxford Forestry Institute, University of Oxford, UK: 128 str.
- Ganopoulos I., Aravanopoulos F., Argiriou A., Tsafaris A. 2012. Genome and population dynamics under selection and neutrality: an example of S-allele diversity in wild cherry (*Prunus avium* L.). *Tree genetics & genomes*, 8: 1181-1190.
- Garcia C., Arroyo M., Godoy A., Jordano P. 2005. Mating patterns, pollen dispersal, and the ecological maternal neighbourhood in a *Prunus mahaleb* L. population. *Molecular ecology*, 14: 1821-1830.
- Gömory D., Paule L. 2001. Spatial structure and mating system in wild cherry (*Prunus avium*) population. *Biologia*, 56: 117-123.
- Goudet J. 1995. FSTAT: A computer program to calculate F-statistics. *Journal of heredity*, 86: 485-486.
- Guarino C., Santoro S., De Simone L., Cipriani G. 2009. *Prunus avium*: nuclear DNA study in wild populations and sweet cherry cultivars. *Genome*, 52: 320-337.
- Hamilton M. B. 2009. Population genetics. Wiley–Blackwell: 407 str.

- Hardy O. J., Vekemans X. 1999. Isolation by distance in a continuous population: reconciliation between spatial autocorrelation analysis and population genetics models. *Heredity*, 83: 145-154.
- Hardy O. J., Vekemans X. 2002. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular ecology notes*, 2: 618-620.
- Heuertz M., Hausman J. F., Tsvetkov I., Frascaria-Lacoste N., Vekemans X. 2001. Assessment of genetic structure within and among Bulgarian populations of the common ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Molecular ecology*, 10: 1615-1623.
- Heuertz M., Vekemans X., Hausman J. F., Palada M., Hardy O. J. 2003. Estimating seed vs. Pollen dispersal from spatial genetic structure in the common ash. *Molecular ecology*, 12: 2483-2495.
- Heuertz M., Fineschi S., Anzidei, R., Pastorelli D., Salvini L., Paule L., Frascaria-Lacoste N., Hardy O. J., Vekemans X., Vendramin G. G. 2004a. Chloroplast DNA variation and postglacial recolonization of common ash (*Fraxinus excelsior* L.) in Europe. *Molecular ecology*, 13: 3437-3452.
- Heuertz M., Hausman J. F., Hardy O. J., Vendramin G. G., Frascaria-Lacoste N., Vekemans X. 2004b. Nuclear microsatellites reveal contrasting patterns of genetic structure between western and southeastern European populations of the common ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Evolution*, 58: 976-988.
- Heuertz M., Carnevale S., Fineschi S., Sebastiani F., Hausman J. F., Paule L., Vendramin G. G. 2006. Chloroplast DNA phylogeography of European ashes, *Fraxinus* sp. (*Oleaceae*): roles of hybridization and life history traits. *Molecular ecology*, 15: 2131-2140.
- Hoebee S. E., Menn C., Rotach P., Finkeldey R., Holderegger R. 2006. Spatial genetic structure of *Sorbus torminalis*: The extent of clonal reproduction in natural stands of a rare tree species with a scattered distribution. *Forest ecology and management*, 226: 1-8.
- Hu G. 1993. DNA polymerase-catalyzed addition of nontemplated extra nucleotides to the 3' of a DNA fragment. *DNA and Cell Biology*, 12: 763-770.
- Idžojojić M. 2005. Listopadno drveće i grmlje u zimskom razdoblju. Zagreb, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu: 254 str.
- Idžojojić M. 2009. Dendrologija: list. Zagreb, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu: 903 str.
- Jarni K., De Cuyper B., Brus R. 2012. Genetic variability of wild cherry (*Prunus avium* L.) seed stands in Slovenia as revealed by nuclear microsatellite loci. *PLoS One* 7, 7: e41231. doi: 10.1371/journal.pone.0041231 (09.04.2013)
- Jensen J. S. 2000. Provenance variation in phenotypic traits in *Quercus robur* and *Quercus petraea* in Danish provenance trials. *Scandinavian journal of forest research*, 15: 297-308.
- Jolivet C., Höltken A. M., Liesebach H., Steiner W., Degen B. 2011. Spatial genetic structure in wild cherry (*Prunus avium* L.): I. variation among natural populations of different density. *Tree genetics & genomes*, 7: 271-283.
- Jones A., Stockwell C., Walker D., Avise J. 1998. The molecular basis of a microsatellite null allele from the White Sands pupfish. *Journal of heredity*, 89: 339-342.

- Kobliha J. 2002. Wild cherry (*Prunus avium* L.) breeding program aimed at the use of this tree in the Czech forestry. Journal of forest science, 48: 202-218.
- Kotar M., Brus R. 1999. Naše drevesne vrste. Ljubljana, Slovenska matica: 320 str.
- Kotar M., Maučič M. 2000. Divja češnja (*Prunus avium* L.) – pomembna drevesna vrsta slovenskih gozdov. Gozdarski vestnik, 58: 227-251.
- Kotar M. 2005. Zgradba, rast in donos gozda na ekoloških in fizioloških osnovah. Ljubljana, Zveza gozdarskih društev Slovenije, Zavod za gozdove Slovenije: 500 str.
- Koumi P., Green H. E., Hartley S., Jordan D., Lahec S., Livett R. J., Tsang K. W., Ward D. M. 2004. Evaluation and validation of the ABI 3700, ABI 3100 and the MegaBACE 1000 capillary array electrophoresis instruments for use with short tandem repeat microsatellite typing in a forensic environment. Electrophoresis, 25: 2227-2241.
- Kraigher H., Grech Z. 2004. Operativna izvedba nove zakonodaje s področja gozdnega semenarstva in drevesničarstva. Gozdarski vestnik, 62: 281-287.
- Kutnar L., Zupančič M., Robič D., Zupančič N., Žitnik S., Kralj T., Tavčar I., Dolinar M., Zrnec C., Kraigher H. 2002. Razmejitev provenienčnih območij gozdnih drevesnih vrst v Sloveniji na osnovi ekoloških regij. Zbornik gozdarstva in lesarstva, 67: 73-117.
- Kutschera L., Lichtenegger E. 2002. Wurzelatlas mitteleuropäischer Waldbäume und Sträucher. Graz, Stuttgart, Leopold Stocker: 604 str.
- Le Corre V., Roussel G., Zanetto A., Kramer A. 1998. Geographical structure of gene diversity in *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. III. Patterns of variation identified by geostatistical analyses. Heredity, 80: 464-473.
- Li Y. C., Korol A. B., Fahima T., Beiles A., Nevo E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative function and mutational mechanisms: a review. Molecular ecology, 11: 2453-2465.
- Lian C., Oishi R., Miyashita N., Hogetsu T. 2004. High somatic instability of a microsatellite locus in a clonal tree, *Robinia pseudoacacia*. Theoretical and applied genetics, 108: 836-841.
- Loiselle B. A., Sork V. L., Nason J., Graham C. 1995. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). American journal of botany, 82: 1420-1425.
- Mantel N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer research, 27: 209-220.
- Maggioni L., Lipman E. (ur.) 2006. Report of a Working Group on *Prunus*: Sixth Meeting, 20-21 June 2003, Budapest, Hungary, Seventh Meeting, 1-3 December 2005, Larnaca, Cyprus. Rome, Bioversity International.
- Martinčič A., Wraber T., Jogan N., Podobnik A., Turk B., Vreš B., Ravnik V., Frajman B., Strgulc Krajšek S., Trčak B., Bačič T. 2007. Mala flora Slovenije: ključ za določanje praprotnic in semenk. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 967 str.
- Helsinki declaration. 1993. The Second Ministerial Conference on Protection of Forest in Europe.
- Mills L. S., Allendorf F. W. 1996. The one-migrant-per-generation rule in conservation and management. Conservation biology, 10: 1509-1518.

- Mohanty A., Martín J. P., Aguinagalde I. 2001. A population genetic analysis of chloroplast DNA in wild populations of *Prunus avium* L. in Europe. *Heredity*, 87: 421-427.
- Morand-Prieur M. E., Vedel F., Raquin C., Brachet S., Sihachakr D., Frascaria-Lacoste N. 2002. Maternal inheritance of a chloroplast microsatellite marker in controlled hybrids between *Fraxinus excelsior* and *Fraxinus angustifolia*. *Molecular ecology*, 11: 613-617.
- Muranty H., Schermann N., Dufour J. 1998. Genetic parameters estimated from a wild cherry diallel: consequences for breeding. *Silvae genetica* 47: 249-257.
- Nepveu G. 1993. The possible status of wood quality in oak breeding programs (*Quercus petraea* Liebl and *Quercus robur* L.). *Annals of forest science*, 50, Suppl. 1: 388-394.
- Nocetti M., Brunetti M., Ducci F., Romagnoli M., 2008. Wood characterization of clones selected for valuable timber production: the case study of Italian wild cherry. Noble Hardwood species for rural development: Improvement of agro-environment and timber production. Orvieto, Italy.
- Nocetti M., Brunetti M., Ducci F., Romagnoli M., Santi F. 2010. Variability of wood properties in two wild cherry clonal trials. *Wood science and technology*, 44: 621-637.
- O'Connell L. M., Ritland K. 2004. Somatic mutations at microsatellite loci in western redcedar (*Thuja plicata*: Cupressaceae). *Journal of heredity*, 95: 172-176.
- Oddou-Muratorio S., Demesure-Musch B., Pélissier R., Gouyon P. H. 2004. Impacts of gene flow and logging history on the local genetic structure of a scattered tree species, *Sorbus torminalis* L. Crantz. *Molecular ecology*, 13: 3689-3702.
- Panda S., Martin J. P., Aguinagalde I., Mohanty A. 2003. Chloroplast DNA variation in cultivated and wild *Prunus avium* L: a comparative study. *Plant breeding*, 122: 92-94.
- Peakall R., Smouse P. E. 2006. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes*, 6: 288-295.
- Peakall R., Smouse P. E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28: 2537-2539.
- Pelsy F. 2010. Molecular and cellular mechanisms of diversity within grapevine varieties. *Heredity*, 104: 331-340.
- Pokorn T. 2011. Genotipizacija kultivarjev hmelja (*Humulus lupulus* L.) s fluorescentnimi mikrosatelitnimi markerji: diplomsko delo. (Univerza v Ljubljani). Ljubljana, samozal.
- Poročilo Zavoda za gozdove Slovenije o gozdovih za leto 2011. 2012. Ljubljana, Zavod za gozdove Slovenije: 133 str.
- Pravilnik o določitvi provenienčnih območij. Ur. l. RS, 72/2003.
- Raymond M., Rousset F. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution*, 49: 1283-1286.
- Rice W. R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43: 223-225.
- Rousset F. 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F* – statistics under isolation by distance. *Genetics*, 145: 1219-1228.
- Rousset F. 2000. Genetic differentiation between individuals. *Journal of evolutionary biology*, 13: 58-62.
- Rousset F. 2008. Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Winows and Linux. *Molecular ecology resources*, 8: 103-106.

- Russell K. 2003. EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for wild cherry (*Prunus avium*). Rome, International Plant Genetic Resources Institute: 6 str.
- Santi F., Dufour J. 2010. Differences between Georgian and French wild cherry populations and consequence for wild cherry breeding programmes. *Silvae genetica*, 59: 137-144.
- Schmid T. 2006. *Prunus avium* Linne, 1755. V: Enzyklopädie der Holzgewächse. Landsberg am Lech, Ecomed.
- Schueler S., Tusch A., Scholz F. 2006. Comparative analysis of the within-population genetic structure in wild cherry (*Prunus avium* L.) at the self-incompatibility locus and nuclear microsatellites. *Molecular ecology*, 15: 3231-3243.
- Seznam gozdnih semenskih objektov – stanje na dan 1. 1. 2013. Ur. I. RS, 4/2013.
- Slatkin M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139: 457-462.
- Spiecker H. 2006. Minority tree species – a challenge for multi-purpose forestry. V: Nature-based forestry in central Europe: alternatives to industrial forestry and strict preservation. Diaci J. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire: 47-59.
- Spieth P. T. 1974. Gene flow and genetic differentiation. *Genetics*, 78: 961-965.
- Stoeckel S., Grange J., Fernández-Manjarres J. F., Bilger I., Frascaria-Lacoste N., Mariette S. 2006. Heterozygote excess in a self-incompatible and partially clonal forest tree species – *Prunus avium* L.. *Molecular ecology*, 15: 2109-2118.
- Stokes M. A., Smiley T. L. 1968. An introduction to tree-ring dating. Tucson, University of Arizona Press, 73 str.
- Streiff R., Ducousoo A., Lexer C., Steinkellner H., Gloessl J., Kremer A. 1999. Pollen dispersal inferred from paternity analysis in a mixed oak stand of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl. *Molecular ecology*, 8: 831-841.
- Taberlet P., Luikart G. 1999. Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biological journal of the Linnean Society*, 68, 41-55.
- Tančeva-Crmarić O., Štambuk S., Šatović Z., Kajba D. 2011. Genotipska raznolikost divje trešnje (*Prunus avium* L.) u dijelu prirodne razprostranjenosti u Hrvatskoj. *Šumarski list*, 85: 543-555.
- Testolin R., Marrazzo T., Cipriani G., Quarta R., Verde I., Dettori M. T., Pancaldi M., Sansavini S. 2000. Microsatellite DNA in peach (*Prunus persica* L. Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. *Genome*, 43: 512-520.
- Turček F. J. 1968. Die Verbreitung der Vogelkirsche in den Wäldern durch Vögel. *Waldhygiene*, 129-132.
- Turkec A., Sayar M., Heinze B. 2006. Identification of sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.) and analysis of their genetic relationships by chloroplast sequence-characterised amplified regions (cpSCAR). *Genetic resources and crop evolution*, 53: 1635-1641.
- Turok J., Jensen J., Palmberg-Lerche C., Rusanen K., Russel S., De Vries L., Lipman E., compilers. 1999. Noble Hardwoods Network: report of the third meeting, 13-16 June 1998. Sagadi, Estonia, IPGRI: 116 str.

- Van Oosterhout C., Hutchinson W. F., Wills D. P. M., Shipley P. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular ecology notes*, 4: 535-538.
- Van Oppen M. J. H., Rico C., Turner G. F., Hewitt G. M. 2000. Extensive homoplasy, nonstepwise mutations, and shared ancestral polymorphism at a complex microsatellite locus in Lake Malawi cichlids. *Molecular biology and evolution*, 17: 489-498.
- Vaughan S. P., Russell K. 2004. Characterization of novel microsatellites and development of multiplex PCR for large-scale population studies in wild cherry, *Prunus avium*. *Molecular ecology notes*, 4: 429-431.
- Vaughan S. P., Cottrell J. E., Moodley D. J., Connolly T., Russell K. 2007a. Distribution and fine-scale spatial-genetic structure in British wild cherry (*Prunus avium* L.). *Heredity*, 98: 274-283.
- Vaughan S. P., Cottrell J. E., Moodley D. J., Connolly T., Russell K. 2007b. Clonal structure and recruitment in British wild cherry (*Prunus avium* L.). *Forest ecology and management*, 242: 419-430.
- Vekemans X., Hardy O.J. 2004. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular ecology*, 13: 921-935.
- Waits L. P., Luikart G., Taberlet P. 2001. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and Guidelines. *Molecular ecology*, 10: 249-256.
- Wattier R., Engel C. R., Saumitou-Laprade P., Valero M. 1998. Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Molecular ecology*, 7: 1569-1573.
- Westergren M. 2010. Razvoj in praktična uporaba baz molekularnih podatkov v gozdarstvu: doktorska disertacija (Univerza v Ljubljani). Ljubljana, samozal.
- Zakon o gozdnem reprodukcijskem materialu. Ur. 1. RS, 58/2002, 85/2002, 45/2004.

ZAHVALA

Hvala mentor prof. dr. Robert Brus za veselje podporo in spodbudo skozi ves čas najinega sodelovanja. Hvala za vsa raziskovalna vprašanja, na katera skupaj iščeva odgovore.

Hvala somentor doc. dr. Jernej Jakše za podporo in pomoč pri delu v laboratoriju. Hvala za vse pogovore in odgovore. 'Genetika' je v twoji bližini enostavna.

Za hiter pregled in natančne pripombe se zahvaljujem ocenjevalcema naloge prof. dr. Juriju Diaciju in prof. dr. Davorinu Kajbi.

Hvala Kristi Komel, Tini Košnjek, Danijelu Borkoviču in Tomažu Adamiču za pomoč pri nabiranju vzorcev in zbiranju terenskih podatkov. Čeprav sem v gozdu zelo rad sam, mi je poleg vaše pomoči, zelo prijala tudi vaša družba.

Hvala Matevž Mihelič za obdelavo in pripravo prostorskih podatkov.

Hvala Bart De Cuyper za vso podporo pri laboratorijskem delu na Inštitutu za naravo in Gozd v Belgiji (INBO). Za pomoč v laboratoriju hvala tudi Sabrini Neyrinck in An Van Breusegem.

I'm grateful to Tom Nagel, for reviewing my english text.

Hvala Maja Božič za hiter pregled naloge in potrdilo, da naloga ni plagiat.

Mami in oči, hvala vama za dobor alelno kombinacijo. Hvala pa vam tudi, da sta me skozi ves čas mojega šolanja bolj ali manj pustila pri miru, zaradi česar mi je ostalo še dovolj volje in energije, da prilezem do doktorata.

Hvala mojima najdražjima Tjaši in Savani. Vajina ljubezen mi daje energijo, vajina otroškost me izpopolnjuje, bližina osrečuje.

PRILOGE

Priloga A

Rezultati testa vezavnega neravnovesja. Podane so vrednosti P in standardni odkloni za kombinacije vseh parov lokusov v semenskih objektih. Po uporabi sekvenčnega Bonferronijevega popravka za multiple primerjave (Rice, 1989) pomenijo odebujene vrednosti značilne razlike s 5 % tveganjem.

populacija	lokus 1	lokus 2	P	stand. odklon
Vipavska brda	EMPa004	EMPa005	0.11931	0.00765
Vipavska brda	EMPa004	EMPa015	0.11800	0.00696
Vipavska brda	EMPa004	EMPaS12	0.11393	0.00365
Vipavska brda	EMPa004	EMPaS14	0.90383	0.00214
Vipavska brda	EMPa004	EMPaS06	0.07449	0.00423
Vipavska brda	EMPa004	PceGA34	0.03123	0.00493
Vipavska brda	EMPa004	UDP98-412	0.00913	0.00113
Vipavska brda	EMPa005	EMPa015	0.02527	0.00362
Vipavska brda	EMPa005	EMPaS12	0.00092	0.00028
Vipavska brda	EMPa005	EMPaS14	0.25550	0.00484
Vipavska brda	EMPa005	EMPaS06	0.00161	0.00051
Vipavska brda	EMPa005	PceGA34	0.12888	0.01304
Vipavska brda	EMPa005	UDP98-412	0.33026	0.00899
Vipavska brda	EMPa015	PceGA34	0.13307	0.01199
Vipavska brda	EMPa015	UDP98-412	0.16978	0.00658
Vipavska brda	EMPaS12	EMPa015	0.05079	0.00281
Vipavska brda	EMPaS12	EMPaS14	0.49599	0.00327
Vipavska brda	EMPaS12	PceGA34	0.28750	0.00905
Vipavska brda	EMPaS12	UDP98-412	0.51462	0.00460
Vipavska brda	EMPaS14	EMPa015	0.31082	0.00447
Vipavska brda	EMPaS14	PceGA34	0.40106	0.00615
Vipavska brda	EMPaS14	UDP98-412	0.12445	0.00257
Vipavska brda	EMPaS02	EMPa004	0.03040	0.00241
Vipavska brda	EMPaS02	EMPa005	0.05168	0.00466
Vipavska brda	EMPaS02	EMPa015	0.31373	0.00905
Vipavska brda	EMPaS02	EMPaS12	0.00007	0.00004
Vipavska brda	EMPaS02	EMPaS14	0.41847	0.00426
Vipavska brda	EMPaS02	EMPaS06	0.00084	0.00027
Vipavska brda	EMPaS02	PceGA34	0.01735	0.00268
Vipavska brda	EMPaS02	UDP98-412	0.03041	0.00197
Vipavska brda	EMPaS06	EMPa015	0.08841	0.00508
Vipavska brda	EMPaS06	EMPaS12	0.02495	0.00151
Vipavska brda	EMPaS06	EMPaS14	0.31725	0.00405
Vipavska brda	EMPaS06	PceGA34	0.01906	0.00348
Vipavska brda	EMPaS06	UDP98-412	0.01311	0.00119

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

populacija	lokus 1	lokus 2	P	stand. odklon
Vipavska brda	UDP98-412	PceGA34	0.03184	0.00331
Ilirska Bistrica	EMPa004	EMPa005	0.87959	0.00353
Ilirska Bistrica	EMPa004	EMPa015	0.25930	0.00749
Ilirska Bistrica	EMPa004	EMPaS12	0.39464	0.00696
Ilirska Bistrica	EMPa004	EMPaS14	0.03184	0.00144
Ilirska Bistrica	EMPa004	EMPaS06	0.24806	0.00531
Ilirska Bistrica	EMPa004	PceGA34	0.59720	0.00919
Ilirska Bistrica	EMPa004	UDP98-412	0.09219	0.00341
Ilirska Bistrica	EMPa005	EMPa015	0.64000	0.00913
Ilirska Bistrica	EMPa005	EMPaS12	0.13435	0.00521
Ilirska Bistrica	EMPa005	EMPaS14	0.14483	0.00347
Ilirska Bistrica	EMPa005	EMPaS06	0.45468	0.00720
Ilirska Bistrica	EMPa005	PceGA34	0.43603	0.01055
Ilirska Bistrica	EMPa005	UDP98-412	0.28656	0.00690
Ilirska Bistrica	EMPa015	PceGA34	0.72360	0.01119
Ilirska Bistrica	EMPa015	UDP98-412	0.88983	0.00467
Ilirska Bistrica	EMPaS12	EMPa015	0.93727	0.00337
Ilirska Bistrica	EMPaS12	EMPaS14	0.17292	0.00381
Ilirska Bistrica	EMPaS12	PceGA34	0.86422	0.00703
Ilirska Bistrica	EMPaS12	UDP98-412	0.61141	0.00657
Ilirska Bistrica	EMPaS14	EMPa015	0.16026	0.00422
Ilirska Bistrica	EMPaS14	PceGA34	0.37114	0.00642
Ilirska Bistrica	EMPaS14	UDP98-412	0.35327	0.00469
Ilirska Bistrica	EMPaS02	EMPa004	0.26754	0.00684
Ilirska Bistrica	EMPaS02	EMPa005	0.65437	0.00741
Ilirska Bistrica	EMPaS02	EMPa015	0.90708	0.00482
Ilirska Bistrica	EMPaS02	EMPaS12	0.39409	0.00857
Ilirska Bistrica	EMPaS02	EMPaS14	0.22218	0.00451
Ilirska Bistrica	EMPaS02	EMPaS06	0.23237	0.00689
Ilirska Bistrica	EMPaS02	PceGA34	0.82042	0.00821
Ilirska Bistrica	EMPaS02	UDP98-412	0.09211	0.00451
Ilirska Bistrica	EMPaS06	EMPa015	0.86901	0.00533
Ilirska Bistrica	EMPaS06	EMPaS12	0.37015	0.00782
Ilirska Bistrica	EMPaS06	EMPaS14	0.09476	0.00247
Ilirska Bistrica	EMPaS06	PceGA34	0.95179	0.00321
Ilirska Bistrica	EMPaS06	UDP98-412	0.40765	0.00669
Ilirska Bistrica	UDP98-412	PceGA34	0.98307	0.00164
Vrhnička	EMPa004	EMPa005	0.07771	0.00329
Vrhnička	EMPa004	EMPa015	0.79193	0.00475
Vrhnička	EMPa004	EMPaS12	0.61341	0.00339
Vrhnička	EMPa004	EMPaS14	0.80319	0.00229
Vrhnička	EMPa004	EMPaS06	0.06805	0.00301
Vrhnička	EMPa004	PceGA34	0.05970	0.00344

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

populacija	lokus 1	lokus 2	P	stand. odklon
Vrhnički	EMPa004	UDP98-412	0.16716	0.00397
Vrhnički	EMPa005	EMPa015	0.59095	0.01054
Vrhnički	EMPa005	EMPaS12	0.31879	0.00459
Vrhnički	EMPa005	EMPaS14	0.01824	0.00104
Vrhnički	EMPa005	EMPaS06	0.40237	0.00985
Vrhnički	EMPa005	PceGA34	0.21665	0.01029
Vrhnički	EMPa005	UDP98-412	0.58095	0.00816
Vrhnički	EMPa015	PceGA34	0.08610	0.00865
Vrhnički	EMPa015	UDP98-412	0.01690	0.00262
Vrhnički	EMPaS12	EMPa015	0.18015	0.00400
Vrhnički	EMPaS12	EMPaS14	0.56680	0.00259
Vrhnički	EMPaS12	PceGA34	0.06918	0.00319
Vrhnički	EMPaS12	UDP98-412	0.70582	0.00376
Vrhnički	EMPaS14	EMPa015	0.87622	0.00277
Vrhnički	EMPaS14	PceGA34	0.78246	0.00461
Vrhnički	EMPaS14	UDP98-412	0.60994	0.00350
Vrhnički	EMPaS02	EMPa004	0.60273	0.00696
Vrhnički	EMPaS02	EMPa005	0.40861	0.01077
Vrhnički	EMPaS02	EMPa015	0.93949	0.00439
Vrhnički	EMPaS02	EMPaS12	0.18764	0.00386
Vrhnički	EMPaS02	EMPaS14	0.49737	0.00441
Vrhnički	EMPaS02	EMPaS06	0.54951	0.01000
Vrhnički	EMPaS02	PceGA34	0.08958	0.00714
Vrhnički	EMPaS02	UDP98-412	0.63014	0.00771
Vrhnički	EMPaS06	EMPa015	0.12491	0.00701
Vrhnički	EMPaS06	EMPaS12	0.38773	0.00532
Vrhnički	EMPaS06	EMPaS14	0.41646	0.00433
Vrhnički	EMPaS06	PceGA34	0.06456	0.00732
Vrhnički	EMPaS06	UDP98-412	0.14788	0.00626
Zavrč	EMPa004	PceGA34	0.40902	0.01068
Zavrč	EMPa004	EMPa005	0.08483	0.00269
Zavrč	EMPa004	EMPa015	1.00000	0.00000
Zavrč	EMPa004	EMPaS12	0.67735	0.00447
Zavrč	EMPa004	EMPaS14	0.17843	0.00213
Zavrč	EMPa004	EMPaS06	0.90586	0.00337
Zavrč	EMPa004	PceGA34	0.78441	0.00629
Zavrč	EMPa004	UDP98-412	0.55724	0.00571
Zavrč	EMPa005	EMPa015	0.00396	0.00075
Zavrč	EMPa005	EMPaS12	0.54471	0.00530
Zavrč	EMPa005	EMPaS14	0.61423	0.00260
Zavrč	EMPa005	EMPaS06	0.44705	0.00728
Zavrč	EMPa005	PceGA34	0.37039	0.00820
Zavrč	EMPa005	UDP98-412	0.15936	0.00473

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

populacija	lokus 1	lokus 2	P	stand. odklon
Zavrč	EMPa015	PceGA34	0.57779	0.01711
Zavrč	EMPa015	UDP98-412	0.88363	0.00624
Zavrč	EMPaS12	EMPa015	0.88113	0.00553
Zavrč	EMPaS12	EMPaS14	0.79464	0.00210
Zavrč	EMPaS12	PceGA34	0.66683	0.00791
Zavrč	EMPaS12	UDP98-412	0.72495	0.00575
Zavrč	EMPaS14	EMPa015	0.12626	0.00329
Zavrč	EMPaS14	PceGA34	0.56515	0.00393
Zavrč	EMPaS14	UDP98-412	0.96577	0.00086
Zavrč	EMPaS02	EMPa004	0.89308	0.00349
Zavrč	EMPaS02	EMPa005	0.31620	0.00718
Zavrč	EMPaS02	EMPa015	0.60898	0.01449
Zavrč	EMPaS02	EMPaS12	0.62109	0.00718
Zavrč	EMPaS02	EMPaS14	0.31368	0.00369
Zavrč	EMPaS02	EMPaS06	0.23849	0.00934
Zavrč	EMPaS02	PceGA34	0.19436	0.00916
Zavrč	EMPaS02	UDP98-412	0.85805	0.00496
Zavrč	EMPaS06	EMPa015	0.51366	0.01383
Zavrč	EMPaS06	EMPaS12	0.58730	0.00794
Zavrč	EMPaS06	EMPaS14	0.04520	0.00152
Zavrč	EMPaS06	PceGA34	0.88040	0.00625
Zavrč	EMPaS06	UDP98-412	0.50171	0.00828
Zavrč	UDP98-412	PceGA34	0.68209	0.00911

Priloga B

Značilnosti klonskih skupin v semenskem sestoju Vipavska brda. Podano je število dreves v klonskih skupinah (N); aritmetična sredina (\bar{x}); standardni odklon, maksimalna razdalja med drevesi znotraj klomske skupine in površina klena.

št. klomske skupine	N	debelina		razdalja		površina	
		\bar{x} (cm)	stand. odklon	\bar{x} (m)	stand. odklon	max. (m)	(m ²)
1	16	24.45	5.86	12.68	6.53	29.71	334
2	11	23.97	9.48	11.30	6.12	23.50	218
3	9	18.67	8.73	5.07	2.32	10.26	37
4	18	20.04	6.71	9.20	4.88	20.77	155
5	21	29.13	6.70	13.37	6.19	30.05	374
6	9	29.19	3.14	7.81	3.61	17.63	82
7	11	28.95	8.84	16.25	8.11	34.20	357
8	2	23.80	2.12	8.41	/	8.41	/
9	3	19.87	3.06	12.80	8.71	19.19	/
10	2	17.45	3.04	6.31	/	6.31	/
11	2	23.50	4.24	2.83	/	2.83	/
12	2	21.35	0.35	5.02	/	5.02	/
13	2	19.10	6.22	2.78	/	2.78	/
14	2	27.50	1.41	20.19	/	20.19	/
15	7	20.40	6.02	7.31	4.49	14.30	34
16	2	21.90	2.26	3.00	/	3.00	/
17	6	26.82	3.29	6.40	3.82	11.86	18
18	8	22.90	6.93	18.53	18.55	55.72	214
19	5	28.60	4.13	9.19	3.31	13.47	72
20	2	22.85	0.35	7.27		7.27	/
21	6	24.42	4.83	14.16	6.16	25.95	211
22	2	25.05	3.61	2.74	/	2.74	/
23	6	25.88	7.73	21.55	12.50	40.59	281
24	5	16.70	5.36	6.01	2.78	9.72	25
25	4	37.83	8.81	6.15	2.11	8.14	/
26	2	23.65	2.76	5.57	/	5.57	/
27	3	16.27	6.60	4.99	3.36	7.44	/
28	6	24.05	3.75	7.92	4.00	15.51	33
29	3	24.33	4.71	4.51	1.39	5.69	/
		\bar{x}	6.1	23.75	4.86	8.94	3.76
SKUPNO		min.	2	16.27	0.34	2.74	/
		max.	21	37.83	9.48	21.55	18.55
						55.72	374

Priloga C

Kazalniki genetske variabilnosti mikrosatelitskih lokusov v posameznih semenskih sestojih. (N) število dreves; (A) število alelov; (A_R) število alelov neodvisno od velikosti vzorca; (A_e) efektivno število alelov; (N_{priv}) število privatnih alelov; (H_O) opažena heterozigotnost; (H_E) pričakovana heterozigotnost; (F_{IS}) Wrightov koeficient inbridinga. Vse koeficiente inbridinga smo testirali, vendar po uporabi sekvenčnega Bonferronijevega popravka za multiple primerjave (Rice, 1989) značilnih odstopanj od Hardy–Weibergovega ravnovesja nismo potrdili.

populacija	lokus	N	A	A_R	A_e	N_{priv}	H_O	H_E	F_{IS}
Vipavska brda	EMPaS02	69	5	4.847	3.189	0	0.783	0.691	-0.133
	EMPa004	69	6	5.336	4.088	1	0.638	0.761	0.163
	EMPa005	69	9	6.570	2.924	3	0.710	0.663	-0.072
	EMPaS06	69	8	6.249	3.342	3	0.783	0.706	-0.110
	EMPaS12	69	4	3.435	2.806	0	0.754	0.648	-0.164
	EMPaS14	69	3	2.682	1.549	0	0.420	0.357	-0.179
	EMPa015	69	9	7.582	2.582	1	0.652	0.617	-0.057
	UDP98-412	68	5	4.675	3.404	1	0.721	0.711	-0.013
	PceGA34	64	12	10.425	6.445	2	0.922	0.852	-0.083
Ilirska Bistrica	EMPaS02	32	6	6.000	3.272	0	0.656	0.705	0.071
	EMPa004	32	5	4.937	2.046	0	0.531	0.519	-0.023
	EMPa005	32	6	5.875	3.751	0	0.719	0.745	0.036
	EMPaS06	32	6	5.875	3.807	0	0.750	0.749	-0.001
	EMPaS12	32	5	5.000	3.587	0	0.781	0.733	-0.067
	EMPaS14	32	3	3.000	2.909	0	0.531	0.667	0.206
	EMPa015	32	9	8.810	3.717	1	0.719	0.743	0.033
	UDP98-412	32	5	5.000	3.580	0	0.688	0.732	0.062
	PceGA34	32	8	7.935	4.730	0	0.844	0.801	-0.054
Vrhnika	EMPaS02	31	7	6.967	3.633	1	0.742	0.737	-0.007
	EMPa004	31	5	4.967	2.318	0	0.548	0.578	0.052
	EMPa005	31	7	6.903	3.520	1	0.871	0.728	-0.201
	EMPaS06	31	7	6.999	4.449	1	0.710	0.788	0.101
	EMPaS12	31	5	4.968	2.673	1	0.484	0.636	0.242
	EMPaS14	31	3	3.000	2.658	0	0.387	0.634	0.393
	EMPa015	31	9	8.935	4.081	2	0.742	0.767	0.034
	UDP98-412	31	6	5.968	4.038	0	0.677	0.765	0.116
	PceGA34	30	10	10.000	5.233	1	0.800	0.823	0.028
Zavrc	EMPaS02	31	6	5.999	4.098	0	0.613	0.768	0.205
	EMPa004	31	5	4.968	3.821	1	0.774	0.750	-0.032
	EMPa005	31	5	5.000	2.439	0	0.774	0.600	-0.297
	EMPaS06	31	5	5.000	3.988	0	0.839	0.762	-0.103
	EMPaS12	31	5	5.000	3.798	0	0.903	0.749	-0.21
	EMPaS14	31	3	3.000	2.021	0	0.290	0.513	0.439
	EMPa015	31	11	10.870	6.240	3	0.806	0.854	0.056
	UDP98-412	31	6	5.967	3.783	0	0.903	0.748	-0.212
	PceGA34	30	9	9.000	5.028	3	0.900	0.815	-0.107