

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

Fakulta lesnická a dřevařská

Katedra genetiky a fyziologie lesních dřevin



**Prostorová schémata semenných sadů lesních dřevin**

Disertační práce

Autor: Ing. Kateřina Chaloupková

Školitel: prof. Ing. Milan Lstibůrek, MSc., Ph.D.

Praha 2022

**Czech University of Life Sciences Prague**

Faculty of Forestry and Wood Sciences

Department of Genetics and Physiology of Forest Trees



**Spatial seed orchard layouts of forest trees**

Ph.D. Thesis

Author: Ing. Kateřina Chaloupková

Supervisor: prof. Ing. Milan Lstibůrek, MSc., Ph.D.

Prague 2022

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma Prostorová schémata semenných sadů lesních dřevin vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací a doporučení školitele. Souhlasím se zveřejněním disertační práce dle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách v platném znění, a to bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Praze dne

Podpis autora

## **Poděkování**

Touto cestou si dovoluji poděkovat všem spoluautorům odborných článků za jejich spolupráci na rukopisech, na jejichž základě mohla tato disertační práce vzniknout. Velké díky patří mému školiteli prof. Milanovi Lstibůrkovi za jeho vedení v průběhu celého studia a čas, který mi věnoval.

## **Abstrakt**

Semenné sady lesních dřevin jsou významným zdrojem reprodukčního materiálu pro obnovu lesních porostů. Při jejich zakládání a obhospodařování je nutné dodržovat daná pravidla. Kromě pečlivého výběru zastoupených genotypů je nutné věnovat pozornost i způsobu křížení. Vzhledem k tomu, že pravděpodobnost křížení dvou jedinců je závislá, mimo jiné na jejich vzdálenosti, lze vzorec křížení ovlivnit právě prostorovým rozmístěním genotypů. Dostupné designy semenných sadů proto staví právě na tomto předpokladu. Tato problematika je včetně konkrétních designů popsána v teoretické části práce. Stejně tak jsou detailně popsány a zdůvodněny obecně přijímané požadavky na kvalitní design semenného sadu. V praktické části je prezentován originální Optimum Neighborhood Algorithm (ONA), který podporuje náhodnost křížení, tedy panmixii. Algoritmus definuje panmixii v semenném sadu jako stav, kdy spolu všechny klony v rámci sadu přímo sousedí se stejnou četností. K docílení tohoto stavu byl využit vzorec pro výpočet rozptylu, který je zároveň minimalizovanou kritériální funkcí. Z takto definované panmixie vychází i další prezentované nástroje a přístupy. Jedná se o hybridní algoritmus, který zohledňuje různé typy designů a omezujících podmínek. Další nástroj umožňuje prostorově optimalizovat genetickou probírku, opět na bázi ONA algoritmu. Je zde popsán i postup zohledňující asortativního křížení mezi vybranými genotypy doplněný též o vylepšování semenných sadů. Práce porovnává prezentované výsledky s již existujícími designy z pohledu panmixie i minimalizace inbrídingu. Většina výstupů byla přijata k publikování ve třech vědeckých žurnálech. Softwarové nástroje byly naprogramovány v rozhraní R a zpřístupněny veřejnosti v podobě R balíčků.

## **Abstract**

Seed orchards of forest trees are essential sources of reproductive material for reforestation. Seed orchard establishment and management have to follow given rules. In addition to carefully selecting represented genotypes, it is also necessary to pay attention to the actual mating. Given that the probability of crossing two individuals depends, among other things, on their distance, the mating pattern can be influenced by the spatial distribution of genotypes. The available seed orchard designs are therefore based on this assumption. These issues, including existing methods, are described in the thesis's theoretical part. Likewise, generally accepted requirements for seed orchard designs are described and justified in detail. In the practical part, the original Optimum Neighborhood Algorithm (ONA) is presented, which promotes random mating, i.e., panmixia. The algorithm defines panmixia in a seed orchard as a condition where all clones within an orchard are directly adjacent to each other with the same frequency. Consequently, a formula was developed to calculate the variance, a minimized criterion function. The other presented tools and approaches are also based on panmixia. The ONA is a hybrid algorithm that takes into account different types of designs and constraints. Another tool allows for spatial optimization of genetic thinning based on the ONA algorithm. The improvement of existing seed orchards further supplements a procedure that takes into account the assortative mating among selected genotypes. The work compares the presented results with existing designs considering both panmixia and minimization of inbreeding. Most of the outputs were accepted for publication in three scientific journals. The software tools were programmed in the R interface and made available to the public as R packages.

# Zadání



Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

## ZADÁNÍ DISERTAČNÍ PRÁCE

Autorka práce: Ing. Kateřina Chaloupková  
Studijní program: Lesní inženýrství  
Obor: Biologie lesa  
Vedoucí práce: prof. Ing. Milan Lstibůrek, MSc, Ph.D.  
Garantující pracoviště: Katedra genetiky a fyziologie lesních dřevin  
Jazyk práce: Čeština

Název práce: **Prostorová schémata semenných sadů lesních dřevin**

Název anglicky: **Spatial seed orchard layouts of forest trees**

Cíle práce: Cílem práce je odvození originálního prostorového schématu semenných sadů s cílem podpory náhodného křížení (panmixie). V navazující části bude algoritmus rozšířen o řadu provozně významných proměnných ve šlechtitelských programech. Následně bude vytvořena metodika pro vylepšování stávajících semenných sadů se zohledněním původního schématu výsadby s akcentací panmixie dosazením vhodných klonů. Teoretická práce bude rozšířena o zpracování originálního postupu prostorové optimalizace genetické probírky v semenných sadech lesních dřevin. Metodické řešení by mělo být kompatibilní s optimalizačními algoritmy typu „Linear Deployment“. Cílem je též vytvoření volně dostupných softwarových nástrojů pro aplikaci v provozním šlechtění.

Metodika: V práci bude zahrnuta podrobná literární rešerše daného tématu. Všechny nově vytvořené nástroje budou založeny na jednotném algoritmu podpory panmiktického, tedy náhodného, vzorce křížení v semenných sadech. Jednotlivé postupy budou v závěrečné práci systematicky popsány po stránce dílčích algoritmů s prezentací praktických softwarových nástrojů využitelných ve šlechtitelské praxi. Testování teoretických modelů proběhne formou stochastických simulací srovnáním s již publikovanými přístupy a také s nově definovanou teoretickou referenční hladinou. Následně bude využití demonstrováno na reálných schématech semenných sadů. Předpokládá se publikování výstupů v lesnických vědeckých žurnálech v databázi WOS.

Doporučený rozsah práce: 80 stran

Klíčová slova: šlechtění lesních dřevin, semenné sady, prostorová schémata, panmixie

Doporučené zdroje informací:

1. Bondesson FL, Lindgren D (1993) Optimal utilization of clones and genetic thinning of seed orchards. *Silvae Genet* 42:157–163
2. Češka P, Lstibůrek M (2014) Zakládání a rozvoj semenných sadů lesních dřevin u VLS ČR, s.p. Ph.D. dissertation. Faculty of Forestry and Wood Sciences. Czech University of Life Sciences Prague, Czech Republic, 148p.
3. Eriksson G, Ekberg I (2001) An introduction to forest genetics. Uppsala: SLU. ISBN 91-576-6032-8.
4. Falconer DS, Mackay TFC (1996) Introduction to quantitative genetics. Longmans Green, Harlow, Essex, UK, p 464
5. Funda T, El-Kassaby YA (2013) Seed orchard genetics. *Plant Sci Rev* 2012:21–43
6. Giertych M (1975) Seed orchard designs. *Forestry Commission Bulletin* 54. HMSO, London, pp 25–37
7. Kaňák J (2011) Návrh šlechtitelských postupů pro borovici lesní v západních a jižních Čechách (Project of breeding strategies for Scots Pine in the Western and Southern Bohemia). Ph.D. dissertation. Faculty of Forestry and Wood Sciences. Czech University of Life Sciences Prague, Czech Republic, 148
8. Lstibůrek M, El-Kassaby YA (2010) Minimum-inbreeding seed orchard design. *For Sci* 56:603–608
9. Paule L (1992) Genetika a šľachtenie lesných drevín. Bratislava: Príroda, 1992. ISBN 80-07-00409-2.
10. White TL, Adams WT, Neale DB (2007) Forest genetics. CAB International. ISBN 9780851993485.

Předběžný termín: 2021/22 LS - FLD - SDZ

Elektronicky schváleno: 5. 9. 2022  
**prof. Ing. Milan Lstibůrek, MSc, Ph.D.**  
Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno: 5. 9. 2022  
**prof. Ing. Milan Lstibůrek, MSc, Ph.D.**  
Předseda oborové rady

## **Obsah**

1. Úvod .....	11
2. Cíle a hypotézy .....	12
3. Rozbor problematiky .....	13
3.1. Šlechtitelský cyklus .....	13
3.2. Semenné sady .....	14
3.3. Typy semenných sadů .....	15
3.4. Zakládání a management semenných sadů .....	16
3.5. Semenné sady vyšších generací .....	20
3.6. Genetická probírka .....	22
3.7. Optimalizace genetického zisku a genetické diverzity .....	23
3.8. Prostorová schémata semenných sadů .....	24
3.8.1. Požadavky na design .....	25
3.8.2. Stávající designy .....	26
4. Metodika .....	28
4.1. Využití ONA při tvorbě schémat semenných sadů .....	29
4.2. Hodnocení kvality ONA schémat .....	30
4.3. Tvorba hybridních schémat .....	30
4.4. Doplnění existujících výsadeb pomocí ONA .....	32
4.5. Genetická probírka na bázi ONA algoritmu .....	32
4.6. Asortativní křížení s využitím ONA .....	35
5. Výsledky .....	37
5.1. Optimum Neighborhood Seed Orchard Design .....	37
5.2. Current Advances in Seed Orchard Layouts: Two Case studies in Conifers .....	46
5.3. Spatial Allocation of Genetic Thinning in Seed Orchards .....	53
5.4. Využití nástrojů ONA v lesnické praxi .....	63
5.5. Nástroj pro asortativní křížení s využitím ONA .....	65
5.6. Specifické podmínky křížení .....	67
5.7. Softwarová řešení .....	68
6. Diskuse a doporučení pro praxi .....	70
7. Závěr .....	73
8. Zdroje .....	74
9. Přílohy .....	82



## Seznam tabulek, obrázků, schémat a grafů

### Tabulky

1. Specifika scénářů, na kterých byla testována ONA genetická probírka v rámci publikace Chaloupková a kol. (2022). LD značí Linear Deployment.
2. Parametry šesti scénářů, na kterých byl demonstrován nástroj pro zahrnutí asortativního křížení při základního ONA algoritmu. ID1/ID2 a ID3/ID4 značí dvě dvojice klonů, pro které byly definovány různé hodnoty penalizace jejich přímých sousedství při tvorbě schématu.
3. Výsledky testování ONA asortativního křížení na 6 scénářích. Uvedeny jsou váhy separace mezi dvěma dvojicemi vybraných klonů a mezi ostatními klony, počty sousedství mezi těmito dvojicemi klonů ve výsledném schématu a průměr počtů sousedství mezi ostatními dvojicemi klonů.
4. Výsledné hodnoty kritériální funkce při porovnávání různých intenzit separace zvolených dvojic klonů. Příslušné číslo iterace, ve které došlo k nalezení nejoptimálnějšího řešení.

### Obrázky

1. Příklad založeného semenného sadu akácie Mearnesovy (*Acacia mearnsii* De Wild.). Klony jsou vyznačeny barevně a číselně.
2. Příklad doplnění stávající výsadby semenného sadu borovice lesní (*Pinus sylvestris* L.). Zeleně jsou vyznačeny plodící klony, bíle neplodící klony, červeně klony které uhynuli ale byli nahrazeny ze zásoby a žlutě klony, které byli doplněny pomocí ONA.
3. Výsledné schéma pro scénář č. 1, pro hodnotu separace dvojice klonů 1 a 2 rovnou 0,1 a pro dvojici klonů 3 a 4 rovnou 0,5.
4. Výsledné schéma pro scénář č. 4, pro hodnotu separace dvojice klonů 2 a 1 rovnou 1,5 a pro dvojici klonů 3 a 4 rovnou 2.
5. Výsledné schéma pro scénář č.5, pro hodnotu separace dvojice klonů 1 a 2 rovnou 0,5 a pro dvojici klonů 3 a 4 rovnou 1,5.
6. Schéma bez zahrnutí preferenčního křížení.
7. Výsledné schéma pro modelový příklad řešení specifických podmínek křížení. Zahrnutí předpokladu převládajících větrů ve směru od západu k východu do optimalizace prostorového rozvržení semenného sadu s využitím ONA.

## **Grafy**

1. Vztah mezi pozorovanou intenzitou kvetení a odhadnutým stupněm cizosprášení (White a kol. 2007).
2. Vzdálenost mateřských stromů od kontrolního samčího jedince a podíl potomků vzniklých sprášením těchto dvou stromů, přičemž přenos pylu byl zprostředkován: a) větrem ve 120 let starém porostu borovice lesní a b) hmyzem v porostu *Cordia alliodora* Ruiz a Pav. Oken (White a kol 2008).

## **1. Úvod**

V práci je představen originální algoritmus k optimalizaci prostorových schémat semenných sadů s cílem podpory náhodného křížení (Optimum-Neighborhood Allocation, ONA). V dílčích kapitolách je prezentováno využití a rozšíření algoritmu dle deklarovaných cílů dizertační práce. Vlastní řešení jsou ověřena počítačovými simulacemi a demonstrována na reálných příkladech ze šlechtitelské praxe.

Je zde popsán jak samotný matematický algoritmus, tak všechny dostupné nástroje. Jedná se o základní ONA design, který lze využít pro tvorbu nových schémat semenných sadů. Tento základní algoritmus je prezentován v prvním publikovaném výstupu „Optimum-Neighborhood Seed Orchard Design“ (Chaloupková a kol., 2016). Dále je představena metoda použitelná pro vylepšování stávajících výsadeb semenných sadů a design, který kombinuje klonové řady a standardní přístup ke tvorbě schématů. Tyto výstupy jsou popsány ve druhém publikovaném výstupu „Current Advances in Seed Orchard Layouts: Two Case Studies in Conifers“ (Chaloupková a kol., 2019). Poslední, zde prezentovaná publikovaná práce je zaměřena na využití ONA při genetické probírce v semenných sadech. Článek „Spatial Optimization of Genetic Thinning in Seed Orchards (Chaloupková a Lstibůrek, 2022) prezentuje ONA genetickou probírku aplikovanou jak na teoretické zadání, tak na konkrétním semenném sadu.

Dále jsou v práci prezentovány další možnosti využití ONA metodiky, které ještě nebyly publikovány (asortativní křížení, specifické podmínky křížení). Práce také odkazuje na dostupné zdroje softwarových nástrojů, které byly průběhu řešení vytvořeny. Jedná se o nástroje pro tvorbu designů, genetickou probírku i hodnocení již existujících schémat. Uvádím též možnosti dalšího metodického rozšíření a aplikace ONA metodiky.

ONA je efektivní při řešení různých typů zadání a problémů. Splňuje veškeré požadavky na moderní dostupný nástroj managementu semenných sadů. ONA algoritmus a odvozená řešení nacházejí uplatnění v celé řadě šlechtitelských programů v Evropě, Severní i Jižní Americe, Asii, či Austrálii.

## **2. Cíle a hypotézy**

Cílem práce je odvození originálního prostorového schématu semenných sadů s cílem podpory náhodného křížení (panmixie). V navazující části bude algoritmus rozšířen o řadu provozně významných proměnných ve šlechtitelských programech. Následně bude vytvořena metodika pro vylepšování stávajících semenných sadů se zohledněním původního schématu výsadby s akcentací panmixie dosazením vhodných klonů. Teoretická práce bude rozšířena o zpracování originálního postupu prostorové optimalizace genetické probírky v semenných sadech lesních dřevin. Metodické řešení by mělo být kompatibilní s optimalizačními algoritmy typu „Linear Deployment“. Cílem je též vytvoření volně dostupných softwarových nástrojů pro aplikaci v provozním šlechtění.

### **3. Rozbor problematiky**

#### **3.1. Šlechtitelský cyklus**

V rámci šlechtitelského cyklu se pracuje se třemi druhy populací. Jedná se o zdrojovou, či základní populaci, šlechtitelskou populaci a produkční populaci, z nichž každá má jinou funkci a navazují na sebe v jednotlivých etapách šlechtění (Zobel a Talbert 1984). Základní populaci mohou být například přírodní populace v jejich přirozené struktuře (Paule 1992). V případě pokročilých generací šlechtění se ale často jedná o plnosesterská potomstva vybraných rodičovských stromů, která jsou seskupena do podoby genetických testovacích výsadeb. Základní populace zahrnuje až tisíce genotypů. Šlechtitelská populace se skládá z jedinců, kteří jsou vybráni na základě specifických kvantitativních a kvalitativních znaků zahrnutých do šlechtitelského kritéria (Zobel a Talbert 1984). V průběhu selekce je nutné činit kompromis mezi hodnotou selekční odezvy (genetického zisku) a zachováním dostatečné genetické variability uvnitř populace tak, aby bylo možné navázat dalšími šlechtitelskými cykly. Obvyklá velikost této populace činí 200 genotypů (Zobel a Talbert 1984), ale velikosti se značně liší dle konkrétní dřeviny a šlechtitelského programu. White a kol. (2007) upozorňují na skutečnost, že samotná velikost populace nevypovídá o její genetické diverzitě, ale je nutné kalkulovat s její efektivní velikostí. Poslední typ populace v rámci šlechtitelského cyklu je populace tzv. produkční. Ta je zaměřena specificky na zajištění vysokého objemu vyšlechtěného reprodukčního materiálu, nejčastěji osiva v semenných sadech. Může se proto jednat právě o semenné sady či matečnice. Tyto populace jsou po genetické stránce nejméně variabilní (Paule 1992), byť efektivní velikost semenných sadů je ve šlechtitelské praxi značně proměnlivá.

Semenné sady tedy tvoří v podstatě spojnici mezi šlechtitelskými aktivitami a provozním lesnictvím. Jejich prostřednictvím je zajištěna vysoká produkce geneticky kvalitního osiva pro obnovu lesních porostů. V rámci šlechtitelského cyklu reprezentují semenné sady produkční populace a celý šlechtitelský cyklus v podstatě uzavírají. Jejich prostřednictvím je tedy umožněno naplnění cílů šlechtitelského programu (McKeand a Weir, 2000; White a kol., 2007). Nejčastějšími cíli šlechtitelských programů, v závislosti na konkrétním druhu dřeviny, jsou dle Pauleho (1992) zvýšení produkce dřevní hmoty a taktéž odolnosti proti biotickým a abiotickým činitelům. Například Anderson (1999) definuje následující cíle: (1.) nutnost požadované produkce fyziologicky kvalitního osiva, (2.) vysoká adaptabilita budoucích porostů, (3.) navýšení hodnoty hospodářsky významných znaků a zachování dostatečné genetické diverzity. Těmto cílům odpovídají i konkrétní šlechtitelské programy, které jsou často koncipovány pro

specifické populace (Kobliha a Funda 2004; Klápště 2008). Hledání tohoto optima mezi genetickým ziskem a genetickou diverzitou je předmětem mnoha výzkumů (Kang 2001; White a kol 2007; Kaňák a kol. 2008).

### **3.2.Semenné sady**

Semenné sady lesních dřevin jsou v literatuře nejčastěji definovány jako výsadby, které byly založeny pro účely produkce geneticky kvalitního osiva, případně pro sekundární naplnění dalších cílů (Paule 1992; Zobel a Talbert 1984; Kaňák a kol. 2008). Autoři Zobel a Talbert (1984) navíc zdůrazňují skutečnost, že významnou výhodou takových výsadeb je také časová a finanční úspora. Po právní stránce upravuje problematiku semenných sadů zákon č. 149/2003 o uvádění reprodukčního materiálu do oběhu doplněný prováděcí vyhláškou č. 29/2004 Sb. Pro sběr osiva lesních dřevin lze legálně použít pouze uznané zdroje reprodukčního materiálu. Semenné sady prvních generací jsou zdroji kvalifikovanými a sady pokročilých generací již zdroji testovanými. Semenný sad musí před samotným uznáním splňovat řadu požadavků a o jejich naplnění je vedena podrobná dokumentace (Kaňák 2008; Kotrla a Pařízek 2009). Komplexní rešerše na téma semenných sadů byla zpracována autory Funda a El-Kassaby (2013).

Výzkumy provedené ve Švédsku dokazují, že osivo původem ze semenných sadů je z pohledu produkčních znaků prokazatelně kvalitnější oproti osivu původem z výběrových porostů (Wennström a kol. 2007). V rámci České republiky bylo takové porovnání s obdobným výsledkem provedeno mezi semenným sadem první generace a uznaným zdrojem reprodukčního materiálu – lesním porostem (Kobliha a Funda 2004). V případě semenných sadů druhé generace je samozřejmě dosaženo ještě větších rozdílů (až 25%). Lze tedy předpokládat, že porosty založené osivem ze semenných sadů budou v budoucnu produkčně superiorní (Zavadil 1982).

Pro představu dále uvádím, jak velké plochy zaujímají semenné sady v některých Evropských zemích. Například v oblasti Švédska i Polska je souhrnná plocha semenných sadů v řádu stovek hektarů (Češka 2014; Kowalczyk a Lindgren 2012). Ve Finsku zabírají pouze pro borovici lesní a smrk ztepilý plochu 900 ha (Haapanen 2007). V Turecku se v roce 2007 jednalo o plochu o rozloze 1200 ha (Murak a kol. 2007). Relativně malou plochu pak sady zabírají například v Chorvatsku, kde se jedná pouze o několik desítek hektarů (Kowalczyk a Lindgren 2012). Podle Hayda a kol. (2019) zabíraly semenné sady na Ukrajině v roce 2019 plochu

přibližně 1300 ha. V České Republice se setkáme se semennými sady především pro hospodářsky významné jehličnany. Tento trend se ale v poslední době mění. V roce 2006 bylo u nás evidováno celkem 146 sadů. Společným znakem těchto sadů je výměra do 1,5 ha (Rambousek 2003; Musil a kol. 2007). Většinou se jedná o klonové semenné sady 1. generace (Kaňák 2011). Semenné sady jsou vedeny v ústřední evidenci uznaných zdrojů reprodukčního materiálu (Pařízek 2014). Další informace k semenným sadům lze vyhledat například v databázi Treebreedex.

### 3.3. Typy semenných sadů

Základní dělení semenných sadů je založena na jejich způsobu založení. Setkáme se tedy se semennými sady klonovými a jádrovými. Můžeme také zohlednit, zda je klonový sad založen pouze z vegetativních kopií daného druhu či provenience, nebo se jedná o biklonální či monoklonální semenný sad (Zobel a kol. 1958; Zobel a Talbert 1984; Paule 1992 White a kol. 2007; Eriksson a kol. 2007). Nejčastěji používaným typem semenných sadů jsou klonové semenné sady. Tento typ sadů zajišťuje spolehlivý transfer genů do budoucích porostů (Giertych 1975).

Jádrové semenné sady jsou zakládány ze semenáčků vzniklých volným sprášením, nebo kontrolovaným opylením mezi vybranými jedinci. Obvykle se jedná zároveň o testovací výsadbu potomstev a cílem je použití nejlepších stromů jako zdroje osiva (Eriksson a kol. 2007). Jádrové semenné sady je možné využít pro dosažení hned několika šlechtitelských cílů na jedné lokalitě. Nejprve založeny jako genetické testy a následně převedeny na produkční sady. Jádrové semenné sady je vhodné zakládat pro ty druhy dřevin u nichž dochází k nástupu plodnosti v nízkém věku. Dalšími důvody pro založení jádrového sadu může být problematická vegetativní propagace daného druhu či nedostupnost materiálu k propagaci. Tímto způsobem jsou zakládány především první generace semenných sadů exotických dřevin. Snaha o současné využití testů potomstev jakožto produkčních populací často vede ke snížení plodnosti sadu či k získání nepřesných výsledků testů (White a kol. 2007).

Klonové semenné sady jsou zakládány vegetativně jednou z mnoha dostupných metod. Jedinci v sadu jsou tedy identickými kopiemi výběrových stromů. V praxi se jedná o nejčastější typ semenných sadů (Paule 1992). Tyto jedince nazýváme ortety. Při vegetativní propagaci je z ortetu přenesena nejen genetická informace, ale taktéž stupeň ontogenetického vývoje. Z tohoto důvodu je vhodné tento typ semenných sadů zakládat pro evropské dřeviny s pozdním

nástupem plodnosti. Vegetativní kopie ortetu jsou označovány jako tzv. ramety. Ve světě jsou klonové semenné sady nejběžněji používaným zdrojem geneticky vylepšeného osiva v provozním lesnictví. Například ve Spojených státech vyprodukují ročně množství osiva, které by bylo dostačující pro zalesnění 90% celkové plochy vytěžených jehličnanů (White a kol. 2007). Klonové semenné sady lze dělit dále na mezidruhové, meziprovenienční a vnitroprovenienční (Eriksson a kol. 2007). Můžeme se setkat také s biklonálními či monoklonálními semennými sady. Biklonální sady hybridů druhů *Abies cilicica* a *Abies cephalonica* lze nalézt například na stanici Truba (Kobliha a kol. 2012). Klonové sady je možné zakládat pouze v případech, kdy je jednoduché získat vegetativní materiál z výběrových stromů pro další množení. Jsou upřednostňovány v případech, kdy daný druh plodí až ve vyšším věku (po 10 až 20 letech), a kdy je primárním účelem založení sadu právě získání geneticky vhodného osiva (White a kol. 2007).

Kromě již zmíněné produkce kvalitního osiva spočívá význam semenných sadů také v ochraně a reprodukci genofondu. Tento aspekt se stává v posledních letech stále významnějším, především ve vztahu k probíhajícím změnám klimatu. Je však nutné, zejména pro pokročilé generace semenných sadů, hledat kompromis mezi genetickým ziskem a jejich genetickou diverzitou (Kang 2001).

### **3.4. Zakládání a management semenných sadů**

Založení semenného sadu předchází průzkum potřeb reprodukčního materiálu. Motivací pro jeho založení bývá nedostatek kvalitního osiva. Nejčastěji jsou při zakládání sadu sledovány dva cíle, a to budoucí ekonomický přínos a snaha o záchranu a reprodukci genofondu. Při zakládání semenných sadů by měly být pečlivě zváženy všechny faktory, které již nelze během jeho provozu dále měnit.

Management semenného sadu je komplexní a zahrnuje jeho založení, dlouhodobou údržbu a periodickou sklizeň osiva. Z důvodu snížení provozních nákladů jsou semenné sady nejčastěji opylovány větrem. Dochází tedy k tzv. volnému opylení (sprášení). Proto je rozmístění jednotlivých genotypů jedním z hlavních faktorů ovlivňujících způsob křížení a výslednou kvalitu osiva (White a kol. 2007). Ve fázi plánování výsadby sadu je nutné rozhodnout, jakým způsobem budou jednotlivé stromy rozmístěny na ploše sadu. Konkrétnímu způsobu prostorového uspořádání říkáme design semenného sadu. Tématem designu semenných sadů se ve své rešerši zabývá Giertych (1975). Většina designů vychází



z předpokladu, že ke křížení dochází především mezi prostorově blízkými jedinci. Tento předpoklad následně potvrdily případové studie (Burczyk a Prat 1997; Chen a kol. 2018). Při zakládání sadu je však třeba zvážit i další faktory, především pak v pokročilých šlechtitelských cyklech. Autoři Hodge a White (1993) uvádí následující kritéria, dle kterých by se měl zohlednit výběr prostorového schématu:

- 1) maximalizace genetického zisku při zachování akceptovatelné genetické diverzity,
- 2) zajištění náhodného křížení (panmixie),
- 3) minimalizace příbuzenského křížení (inbrídingu),
- 4) minimalizace chyb vzniklých chybnou selekcí (možnost následného provedení genetické probírky).

Lze konstatovat, že současné designy tyto podmínky v podstatě naplňují (Lstibůrek a El-Kassaby 2010; El-Kassaby a kol. 2014; Chaloupková a kol. 2019; Liesebach a Liepe 2021).

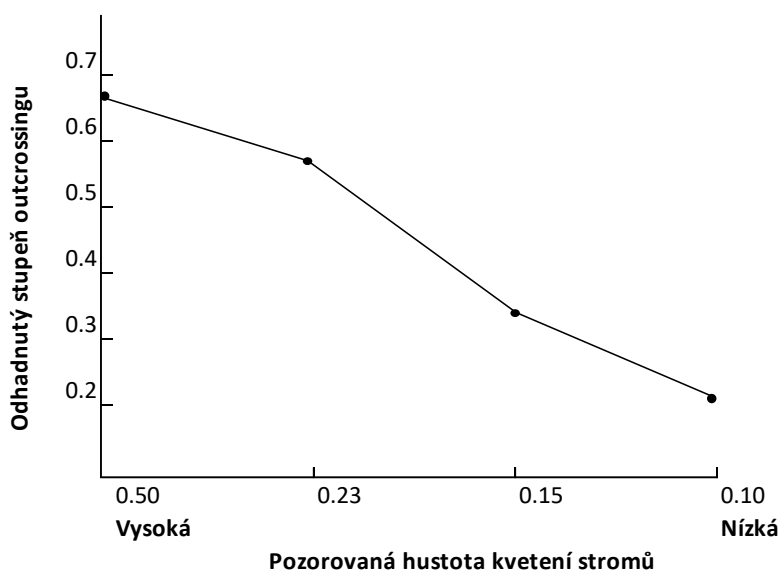
Při výběru lokality pro založení semenného sadu je nutné zvážit několik faktorů. Jednak jeho zeměpisnou polohu, která by měla odpovídat ekologickým nárokům vybrané dřeviny. Dále je při zakládání semenného sadu nutné vybrat takovou plochu, kde nehrozí riziko kontaminace pylem z okolních porostů. Semenný sad tak není opylován jedinci neznámé, většinou nižší, genetické kvality. Při 100% kontaminaci pylem z cizího zdroje je genetický zisk pouze poloviční oproti situaci kdy ke kontaminaci nedochází, za předpokladu absence selekční odezvy ve skupině neznámých rodičovských genotypů (Eriksson a kol. 2007). K největším ztrátám kontaminací, ve smyslu genetického zisku, tak dochází v semenných sadech vyšších generací. Vliv kontaminace se dále navyšuje při vysoké variabilitě reprodukční fenologie klonů (Funda a kol. 2009). Prevence, tedy výběr vhodné lokality, je však v tomto případě klíčová a může zamezit významným ztrátám na genetické kvalitě reprodukčního materiálu. Konkrétní míra kontaminace může být v praxi zkoumána pomocí molekulárních nástrojů. Dostupné studie tuto míru kvantifikují v rozmezí 30% až 40% (Slavov a kol. 2005; Harju a Muona 2008), nebo i vyšší (Pakkanen a kol. 2000; Torimaru a kol. 2009). Nejefektivnější metodou zabránění kontaminaci je použití skleníků. S těmito postupy se setkáme například ve Švédsku (Torimaru a kol. 2013). Velikost semenného sadu by měla reflektovat konkrétní šlechtitelské cíle a aktuální potřeby lesnického provozu. Klíčový je samozřejmě i výběr klonů a jejich zastoupení, kdy je třeba vyvážit genetický zisk a genetickou diverzitu. Této problematice se věnuje samostatná kapitola.

Negativní vliv kontaminace na selekční odezvu je též možné významně redukovat ve specifických šlechtitelských strategiích, jakými je například metoda Breeding without Breeding (El-Kassaby a Lstibůrek 2009). Zde je pro redukci kontaminace použita fenotypová předselekce v testovacích výsadbách, event. přímo v lesních porostech (Lstibůrek a kol. 2011; Lstibůrek a kol. 2012; Lstibůrek a kol. 2015).

Rozmístění klonů na ploše je spolu s jejím výběrem, druhým nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím výslednou kvalitu reprodukčního materiálu. Při volném sprášení totiž prostorový design determinuje vzorec křížení mezi jednicí (Lstibůrek a El-Kassaby 2010). Tento faktor je relativně lehce ovlivnitelný a zcela závislý na volbě šlechtitele. V praxi může docházet k vysokým ztrátám potenciálního genetického zisku z důvodu použití nevhodného designu. Z tohoto důvodu by jeho volbě měla být věnována patřičná pozornost. Význam správného výběru designu narůstá ještě více v případech, kdy se řeší zakládání semenných sadů vyšších generací, kde často některé klony sdílí společné předky, čímž se celé schéma značně komplikuje, protože tak musíme brát v úvahu různé míry příbuznosti. V takovém případě je prioritou zamezení příbuzenského křížení (inbrídingu) a následným projevům inbrední deprese v takto vyprodukovaném potomstvu. V těchto případech je praktickým problémem, z pohledu optimalizační teorie, přílišné omezení optimalizační úlohy řadou podmínek. V praxi je tak vhodnější, v pokročilých generacích, kombinovat nepříbuzné genotypy například mezi sousedními šlechtitelskými populacemi (McKeand a Weir 1980), či přímo na základě environmentálních gradientů v kontextu rozsáhlejších kandidátských populací (Poupon et al. 2021).

Genetickou kvalitu osiva významně ovlivňuje i fenologie kvetení a míra plodnosti jednotlivých klonů. Tyto aspekty přímo ovlivňují vzorec křížení a byly prozkoumávány v mnoha studiích, jejichž výsledky potvrdily jejich význam (Erickson a Adams 1989; El-Kassaby a Reynolds 1990; Nikkanen 2001). Byl pozorován i významný vztah mezi mírou cizosprášení a hustotou kvetení (graf č. 1). Na vzorec křížení má dále vliv i délka kvetení. Například u borovice trvá kvetení konkrétních genotypů vždy jen několik dní (Musil 2003). Případné rozdíly ve fenologii kvetení vedou k nevyváženosti rodičovských příspěvků a nezbytně ke značnému snížení reálné efektivní velikosti populace. Nepřímo je tak ovlivněna i možnost dosáhnout panmiktického křížení (Xie a kol. 1994). Podrobně byla zkoumána i možná synchronizace a hustota kvetení a její vliv na reprodukci v populaci. Za tímto účelem byl vytvořen specifický software (Zas a kol. 2003). Pokud je však fenologie kvetení předem známa, pak je možné předpokládaný vzorec zahrnout jako parametr například při tvorbě MI designu semenného sadu (Lstibůrek a kol. 2015). V rámci některých studií však byly pozorovány nízké

rozdíly ve fenologii a plodnosti mezi klony i v rámci klonů. Je tedy na zvážení, zda tyto aspekty při zakládání sadu zahrnout. Naopak byly pozorovány významné rozdíly v plodnosti v jednotlivých letech (Prescher a kol. 2006).



**Graf 1.** Vztah mezi pozorovanou intenzitou kvetení a odhadnutým stupněm cizosprašení (převzato z White a kol. 2007).

V sadech je v průběhu jejich provozu možné provádět další aktivity jako zavlažování či hnojení. Tyto mohou mít vliv na kvalitu a množství produkce. Případové studie provedené v sadech borovice lesní ve Finsku potvrdily, že optimálním dodáním živin je možné statisticky významně ovlivnit kvetení, produkci semen a jejich kvalitu. Zároveň však bylo zjištěno, že mnohem významnější vliv na produkci má výběr klonů vykazujících vysokou produktivitu (Saarsalmi a kol. 1994). Barnett (1996) uvádí, že umělé přihnojování může pozitivně ovlivnit velikost semen a snížit úroveň dormance. To může snížit další náklady, jelikož nejsou potřeba další předosevní ošetření. Petersen a Ueckert (2005) zkoumali vliv přihnojování a zavlažování na různé ekotypy. Vliv zavlažování na produkci semen nebyl potvrzen. Vliv přihnojování byl významný na plochách, které nebyly zavlažovány a ovlivněna byla především klíčivost semen.

### **Praktická opatření k redukci kontaminace v semenných sadech**

Jak vyplývá z výše zmíněného, kvalitu osiva může výrazně ovlivnit mnoho vnějších faktorů. Většina prací zaměřených na zkoumání zdrojů kontaminace zdůrazňuje význam vzdálenosti potenciálního zdroje pylu neznámého původu. Na její snížení má efektivní vliv například aplikování jakési „nárazníkové zóny“ kolem semenného sadu. Tato zóna zpravidla měří 200 až 500 m. Proti tomuto konceptu však mluví skutečnost, že byl dokázán přenos pylu i ve velmi vysokých částech atmosféry (Wilson 2015).

Management křížení lze rozdělit na dva přístupy, a to na metody používané v běžných sadech a na metody dostupné ve sklenících. Management v otevřených sadech může stavět na regionální izolaci sadu, kdy je zajištěna velká vzdálenost od porostů daného druhu. Dále je možné vycházet z lokální izolace, kdy lze vytvořením nárazníkové zóny o několika set metrech docílit také efektivní ochrany genofondu. Lze se setkat i s přístupem, kde je za nárazníkovou zónu považován okraj sadu. Ke snížení kontaminace může přispět i větší velikost a vyšší věk sadu, kdy již v plné míře kvetou všechny přítomné genotypy. Další možností je podpořit interní křížení volbou prostorového designu. Nejnáročnější metodou, jak lze křížení ovlivnit je asistované hromadné sprášení (White a kol. 2007). Jde o metody, které zvyšují produkci pylu a ovlivňují jeho distribuci v semenném sadu. Je možné podporovat jak dřívější, tak vydatnější samčí kvetení. Dále je také možné manuálně opylovat samičí šištice, což ovšem vyžaduje náročnou izolaci samičích květů. V lokalitách, kde okolní inferiorní porosty kvetou dříve než zvažovaný semenný sad, je možné přistoupit ke kontrolovanému opylení z externích, po fenotypové stránce kvalitních porostů. Tato metoda zajistí zachování alespoň části genetického zisku v situaci, kdy nedojde k synchronizaci kvetení samčích a samičích šištic, nebo není pyl v sadu produkován v dostatečném množství. Hlavní výhodou takto založeného sadu jsou nízké náklady a nároky na jeho budoucí údržbu spolu s vysokou produkcí osiva (Wilson 2015; Weber 1995).

Z pohledu omezení kontaminace pylem je nejefektivnější metodou úplná izolace semenného sadu ve skleníku či fóliovníku. Tyto umělé podmínky však mohou různě ovlivňovat fenologii klonů. Může tak docházet ke snížení produkce semen, které mohou být nekvalitní. Touto problematikou se zabývala řada autorů, kteří shrnuli klíčové body pro úspěšné řízení takových populací. Je doporučeno využívat větších prostor a dodržovat větší spon mezi klony. Podstatný vliv na vitalitu klonů má také správný systém zavlažování, ventilace, hnojení a doplňování oxidu uhličitého. V těchto populacích je možné řídit opylení pomocí vzduchotechniky s využitím směsí pylu ze selektovaných rodičovských genotypů, nebo ho provádět manuálně s ohledem na optimální dobu produkce pylu. Ventilace v těchto dnech musí být omezena (Poykko 2008; Annala 2003; Hagqvist 1992).

### **3.5. Semenné sady vyšších generací**

V našich podmínkách převažují semenné sady první generace. Postupně však dochází k přechodu na generace vyšší. Při tomto přechodu je možné využít některé z nových přístupů,

kteře mohou napomoci urychlit celý šlechtitelský cyklus. Sady první generace byly zakládány především na základě fenotypového výběru. Přechod na vyšší generaci semenného sadu je možný jen prostřednictvím dokončeného šlechtitelského cyklu a jeho primárním cílem je nárůst genetického zisku. Tento nárůst může být značně vysoký, avšak závisí na dědivosti daného znaku a intenzitě selekce. Podle Zobela a Talberta (1984) se s každou další generací jedná v průměru o 10% u běžných hospodářsky významných znaků.

Pro přechod na další generaci je klíčové provedení testů potomstev. Z hlediska finanční a časové náročnosti a požadavků na odbornost provedení jsou tyto testy jednou z nejnákladnějších, nejsložitějších a zároveň i nejdéle trvajících složek šlechtitelského cyklu. Jejich výsledky jsou pro další postup klíčové. Měla by jim proto být věnována náležitá pozornost. S využitím testů potomstev lze semenný sad uznat jako zdroj testovaného reprodukčního materiálu a přikročit tak k založení sadu vyšší generace (White a kol. 2007).

Testovaná potomstva mohou být buď plnosesterská, nebo polosesterská, v závislosti na systému křížení použitém pro jejich získání. Jedním z hlavních cílů testů je odhad aditivní genetické (šlechtitelské) hodnoty rodičovských stromů. Dále se jedná o odhad komponent variance a dědivosti (heritability) a genetického zisku (selekční odezvy). V závislosti na cíli šlechtitelského programu je nutné pro testovací výsadby definovat návrh křížení, který determinuje typ informace, kterou potřebuje šlechtitel prostřednictvím testů získat a návrh pokusného uspořádání, který determinuje kvalitu této informace. Výběr vhodné plochy pro provedení testů je také podstatný.

Při přechodu na další generace je vhodné nejprve prostřednictvím genového screeningu metodou genových markerů ověřit identitu všech klonů a případně určit míru jejich příbuznosti. V praxi se totiž často setkáme s chybným označením ramet. Dále by měly být statisticky analyzovány požadované znaky a přiřazeny jim odpovídající váhy v selekčním kritériu (selekční index). Metoda selekčních indexů je dle White a kol. (2007) optimální v případě, že se zaměřujeme na několik znaků současně, protože sledovaným znakům lze díky ní přiřadit teoreticky optimální váhy.

Semenný sad vyšší generace může být následně založen jak z rodičovské populace, tak i ze samotných testů potomstev, přičemž nejvýhodnější bývá kombinace obou těchto metod (backward and forward selection, White a kol. 2007). Postup, kdy byl pomocí genetické probírky založen klonový semenný sad prezentují například Varghese a kol. (2006).

### 3.6. Genetická probírka

Pro první generaci semenných sadů je typické, že není známa genetická (šlechtitelská) hodnota zastoupených genotypů. Kvůli nízké hodnotě heritability většiny znaků se tak v první generaci sadů často vyskytuje velké množství inferiorních genotypů. Teprve po provedení testů potomstev je možné objektivně porovnat všechny genotypy a případně některé jedince eliminovat. Pro tento účel může být použita následná genetická probírka. Aby ale byla genetická kvalita osiva významně ovlivněna, musí být probírka provedena s dostatečnou intenzitou. To v praxi znamená odstranění velkého počtu genotypů. Jen tak je možné dosáhnout požadované selekční odezvy (Falconer a Mackay 1996). Ke genetické probírce je také možné přistoupit tak, že nejprve stanovíme optimální relativní zastoupení klonů (počty ramet), na základě předpokládaných šlechtitelských hodnot (Bondesson a Lindgren 1993; Lindgren 1993; Prescher a kol. 2008). K tomu lze využít konceptu Linear Deployment (LD) od Lindgrena a Mathesona (1986). Vstupními parametry této metody jsou šlechtitelské hodnoty, požadovaná efektivní velikost populace a stávající počty klonů a ramet (Lindgren and Matheson 1986). Pokud jsou klony příbuzné a příspěvky některých genotypů jsou omezeny, pak lze aplikovat obecnější optimalizační metodu prezentovanou ve Funda a kol. (2009). Žádný z uvedených přístupů ale nezohledňuje prostorovou alokaci genetické probírky. Šlechtitelé tak často přistupují ke genetické probírce spíše systematicky (například odstraněním každého druhého jedince v řadě). Tyto přístupy srovnává v případové studii Kang a kol. (2005) pro dub špičatolistý (*Quercus actussima* Carruth.). Systematická genetická probírka není efektivní z pohledu navýšení genetického zisku, ale může zachovat vysokou genetickou diverzitu. Lineární probírka dosahuje požadované rovnováhy mezi ziskem a diverzitou. Efektivitu genetické probírky samozřejmě ovlivňuje její intenzita. Kang a kol. (2003) uvádějí jakého genetického zisku lze dosáhnout při konkrétních intenzitách pro případovou studii klonového semenného sadu borovice korejské (*Pinus koraiensis* Siebold a Zucc.). Při intenzitě 25% se zisk rovná 3,9%. Při intenzitě 50% pak 6,6%. Takto intenzivní probírku doprovází i významná ztráta diverzity.

Genetická probírka vychází z předpokladu, že šlechtitelské hodnoty jsou známy. Tyto hodnoty bývají v oblasti šlechtění rostlin i zvířat udávány jako konstanty, ačkoli se ve skutečnosti jedná pouze o statistický odhad aditivních genových účinků (Meuwissen 1997).

### 3.7. Optimalizace genetického zisku a genetické diverzity

Hodnota genetického zisku závisí v první řadě na intenzitě selekce. Jeho nárůst je doprovázen ztrátou genetické diverzity. V současnosti jsou kladeny vysoké nároky na její zachování, a ve většině situací se ustupuje od příliš vysoké intenzity selekce a je kladen důraz na zachování rovnovážného stavu. Význam rovnováhy genetického zisku a genetické diverzity zmiňuje množství autorů, například Kang (2001), White a kol. (2008) a Hodge a White (1993). Dalším faktorem, který musí být pečlivě zvážen je tedy počet genotypů. V případě klonových sadů i počet jejich vegetativních kopií (ramet) a možné příbuzenské vztahy mezi nimi. Názory na vhodný počet klonů pro založení sadu první generace se různí. Obvykle je však volen vyšší počet klonů a později následuje probírka, která často dosahuje až 50% intenzity. Alternativou genetické probírky je selektivní sběr osiva. Tento přístup zajistí vysokou produkční kapacitu sadu pro případ zvýšené poptávky po semenné surovině a zároveň zvyšuje kvalitu sebraného oddílu osiva, byť je výsledný genetický zisk redukován paternálními příspěvky nevyřazených inferiorních genotypů.

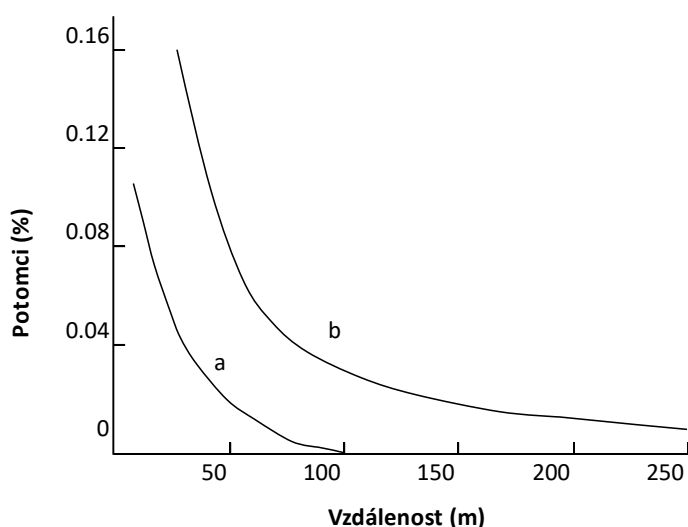
Podle Kaňáka a kol. (2008) je za minimální počet klonů v sadu 1. generace považováno 50 až 60 klonů, každý po 6 až 7 opakováních. Větší semenné sady bývají zřizovány obvykle z 20 až 60 klonů, přičemž každý může být zastoupen až 100 rametami (White a kol. 2007). Tyto čísla jsou dostačující pro zachování vysoké genetické diverzity při současném dosažení kýžené odezvy na selekci. S využitím postupů matematické optimalizace je při znalosti reprodukční fenologie jednotlivých klonů a jejich plodnosti možné efektivně optimalizovat zastoupení genotypů s ohledem na požadovanou diverzitu a maximalizaci genetického zisku (Kang 2001). Podle teoretických studií prováděných na reprodukčním materiálu množeném klonováním by měla být velikost populace rovna 18 blízka optimu (Lstibůrek a El-Kassaby 2010). Pro zkoumání rizik spojených s použitím klonů v lesnictví byla provedena rozsáhlá rešerše (Wu 2018). Podle této rešerše je optimálním počtem 5 až 30 klonů s ohledem na konkrétní druh dřeviny. S takovouto velikostí populace se setkáváme u semenných sadů druhé generace. I takové semenné sady mohou v některých případech sloužit nejen jako populace produkující kvalitní osivo, ale také jako populace zachovávající genetickou rozmanitost (Namkoog a kol. 1988; Frankel a kol. 1995). S takovými populacemi se můžeme setkat například ve Švédsku (Wu 2018). Je ale třeba si uvědomit, že všechny zmíněné studie staví na předpokladu, že v dané populaci dochází k náhodnému křížení a jsou dodrženy i další podmínky Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Jedině tak je možné zachovat deklarovanou genetickou variabilitu populace. Z této skutečnosti vyplývá i další z aspektů významu designu semenného sadu. Prostřednictvím

ovlivnění vzorce křížení a přiblížení se panmiktickému stavu je kromě genetického zisku zajištěna i požadovaná variabilita osiva.

Je zřejmé, že zachování efektivní velikosti populace je důležité i pro samotnou ochranu genofondu daného druhu. Tento aspekt získává v posledních letech na stále větším významu (Kaňák a kol. 2008). Míru genetické diverzity lze vyjádřit i relativním efektivním počtem klonů, což je podíl efektivního počtu klonů a celkového počtu klonů (Bilgen a kol. 2013).

### 3.8. Prostorová schémata semenných sadů

Dodnes byla vyvinuta celá řada algoritmů pro optimalizaci prostorového rozmístění klonů. Nejmodernější a v současnosti nejvíce využívané přístupy jsou založeny na optimalizačních algoritmech které minimalizují inbríding a maximalizují náhodnost křížení (Lstibůrek a kol. 2015, Chaloupková a kol. 2016). Designy vycházejí z faktu, že úspěšnost opylení dvou jedinců je dána především jejich vzdáleností (graf č. 2) a množstvím produkovaného pylu. K ověření těchto teorií se používá především metod DNA markerů (Burczyk a kol. 1996).



**Graf 2.** Vzdálenost mateřských stromů od kontrolního samčího jedince a podíl potomků vzniklých sprášením těchto dvou stromů, přičemž přenos pylu byl zprostředkován: a) větrem ve 120 let starém porostu borovice lesní a b) hmyzem v porostu *Cordia alliodora* Oken. (převzato z White a kol 2008).

K počtu klonů efektivně se podílejícím na produkci semen dospějeme ale až po zhodnocení fenologie kvetení klonů a jejich plodnosti. Míru synchronizace fenologie kvetení klonů uvádí například i El-Kassaby a kol. (1988). Pro hodnocení systému rozmnožování jsou samozřejmě podstatné i další reprodukční charakteristiky jako například to, zda se jedná o druh plodící



každoročně. Pokud tomu tak není, mohou se výsledky produkce v jednotlivých letech značně lišit a je třeba s touto skutečností počítat. Plodné roky se například u smrku ztepilého opakují průměrně po 4 až 5 letech. Podobný, několikaletý reprodukční cyklus je typický pro většinu hospodářských dřevin mírného pásma (Musil 2003). Některé studie sledovaly, kolik samčích jedinců se v přírodních podmínkách podílí na opylení jednoho samičího stromu. Burczyk a kol. (1996) prostudovali vzorec křížení ve vzrostlém porostu větrosnubného druhu *Pinus attenuata* Lemmon. V tomto případě byly samičí šištice jednoho jedince v průměru opylovány 59 dalšími jedinci. Nason a kol. (1996) dále studovali tuto problematiku u sedmi druhů rodu *Ficus*. Zde pozorovali rozmezí 11 až 54 samčích příspěvků. U tropických druhů dřevin se v přírodních podmínkách na reprodukci podílejí významnou měrou pouze dva až tři nejbližší jedinci. To je dáno hustotou a druhovou pestrostí takových porostů. Byla sledována i distribuce pylu až do vzdálenosti 300 metrů (Stacy a kol. 1996). Shimono a kol. (2011) zkoumali vliv různých faktorů na úspěšnost křížení v semenném sadu smrku ztepilého (*Picea abies* L.). Dospěli k závěrům, že 42% potomků lze s vysokou pravděpodobností přiřadit k otcům do vzdálenosti 30 m. Nejvyšší procento potomků se nacházelo ve vzdálenosti do 6 metrů.

### 3.8.1. Požadavky na design

Hlavními požadavky na design klonového semenného sadu je dodržení požadovaných vzdáleností mezi rametami jednotlivých klonů, případně mezi rametami příbuzných klonů pro zamezení samosprášení. Dále je pak nutné zajistit náhodnost křížení, tedy panmixii. Při snaze zajistit tyto podmínky vychází většina designů semenných sadů z předpokladu, že ke křížení dochází nejčastěji mezi blízko sousedícími rametami (Funda a El-Kassaby 2012).

K inbreedingu dochází při křížení příbuzných jedinců. Velmi častý je v malých a izolovaných populacích, jako jsou právě semenné sady (Frankham a kol. 2002). Vzorec, jakým se mezi sebou jedinci v semenném sadu kříží, je hlavním činitelem ovlivňujícím stupeň inbreedingu. Tento vzorec je ovlivněn řadou faktorů, jako jsou genealogie klonů, jejich velikost (počet ramet), reprodukční fenologie, gametické příspěvky, míra samosprášení, prostorové uspořádání jedinců a kontaminace z externích zdrojů (El-Kassaby 1995; Burczyk a Prat 1997).

Jako panmiktický označujeme stav, kdy má každý jedinec stejnou pravděpodobnost, že zplodí potomka s jakýmkoli jiným jedincem opačného pohlaví. Jde tedy o splnění podmínky volné kombinovatelnosti genů. Tím je možné dosáhnout předpokladu modelu Hardy-Weinbergovy rovnováhy. V obecné populační genetice je této náhodnosti dosaženo mimo jiné splněním podmínky neomezené migrace. Ta ovšem není v případě semenného sadu možná.

Proto je zde nutné definovat náhodné křížení na bázi výměny gamet mezi klony, tedy vzájemné blízkosti klonů. Úroveň této výměny souvisí právě s prostorovým uspořádáním sadu. Pro dosažení maximálně panmiktického stavu je nutné zvážit i faktory, jakými jsou produkce pylu, plodnost, vzdálenost klonů a synchronizace fenologie jejich kvetení (Xie a kol. 1994). Prostřednictvím prostorového designu můžeme samozřejmě ovlivnit pouze vzdálenosti klonů.

### 3.8.2. Stávající designy

Pro tvorbu designů semenných sadů se v současnosti již několik desetiletí využívají především počítačové algoritmy. Jeden z prvních takových postupů prezentoval La Batide (1967). Často využívaným přístupem je Computer Organized Orchard Layout (COOL) (Vancalay 1991). COOL design funguje tak, že systematicky udržuje předem definovanou vzdálenost mezi rametami klonů (Bell a Fletcher 1978).

Designy semenných sadů se vyvíjely postupně spolu s pokročilejšími generacemi semenných sadů a většími nároky na prostorové rozvržení. Nejprve byly používány designy zaměřené na celkové znáhodnění, které měly za cíl maximalizovat křížení mezi nepříbuznými jedinci (Giertych 1975; Nester 1994) a designy využívající permutace (Bell a Fletcher 1978; Charkravarty a Bagchi 1993). Následně byly představeny designy, které byly vhodné pro optimalizace sadů vyšších generací. Tyto designy pracují s určitou mírou příbuznosti mezi danými klony. Zároveň umožňují zahrnout asortativní křížení a minimalizují inbrední křížení. Jedná se o Randomized Complete Block Design (White a kol 2007), Minimum Inbreeding design (MI) a jeho další rozšíření (Lstibůrek a El-Kassaby 2010; Lstibůrek a kol. 2015). Zajímavostí MI designu je skutečnost, že se jedná o zatím jediné schéma založené na aplikaci globálního optimalizačního algoritmu.

Specifickou skupinou designů semenných sadů jsou designy využívající klonové řady. Jejich cílem je především zjednodušení managementu sadů při kontrolovaném sprášení, sběru šišek a ošetřování proti škůdcům. Další výhodou těchto designů je také celkové snížení nákladů na zakládání (El-Kassaby 2003; El-Kassaby a kol. 2007; El-Kassaby a kol. 2014). Použití tohoto přístupu je možné, protože v případech některých druhů je samosprášení možné zanedbat (El-Kassaby 2003; El-Kassaby a kol. 2007). Některé studie dokonce přímo potvrzují velice nízkou míru samosprášení v semenných sadech lesních dřevin (Mitton 1992; El-Kassaby 1995; O'Connell 2003). U většiny jehličnanů není pozorování nízké úrovně samosprášení překvapující. Řada studií u nich totiž zaznamenala velkou míru genetické zátěže, výskyt inbrední deprese a také specifickou reprodukční biologii, jakou je např. polyembryonie.

Všechny tyto znaky působí proti možnému samosprášení v rámci klonové řady (Griffin a Lindgren 1985; Woods a Heaman 1989; Williams a Savolainen 1996). Hlavní nevýhodou konceptu klonových řad je skutečnost, že zde vzniká velké množství opakujících se sousedství mezi klony. Tento efekt sousedství vede ke zvýšenému křížení mezi vybranými klony, což není v souladu s požadavkem na panmiktický vzorec křížení napříč celým semenným sadem (Kassaby a kol. 2007). Na řešení tohoto problému je zaměřen design Randomized, Replicated, Staggered Clonal Row design (R2SCR) (El-Kassaby a kol. 2014). V praxi je ale obvykle možné provádět řízené opylování a sběr semen pouze v případě vybraných, superiorních klonů. Z tohoto důvodu není opodstatněné rozmísťovat veškeré jedince právě ve formě klonových řad. Takovýmto přístupem se omezí již zmíněný, nežádoucí sousedský efekt. Optimálního řešení lze tedy docílit např. kombinací MI a ONA designu (Chaloupková a kol. 2019).

V současnosti neexistuje kromě ONA žádný přístup, který by umožňoval efektivní vylepšení stávajícího semenného sadu z pohledu rozmístění přítomných jedinců. Již existující semenné sady jsou však často postiženy značnou mortalitou, která významně snižuje jejich produkční kapacitu. Tato mortalita může být způsobena řadou faktorů jako je nekompatibilita roubů a podnoží, škůdci a choroby (Chaloupková a kol. 2019).

## 4. Metodika

Všechny dále prezentované nástroje jsou založené na jednotném principu ONA (Optimum-Neighborhood Algorithm). ONA je originální přístup k řešení problematiky prostorového rozmístění klonů v semenném sadu. Tento přístup je metodicky popsán v prvním vědeckém článku zahrnutém do této dizertace (Chaloupková a kol. 2016). Jedná se o heuristický přístup, kdy je obsazení každé pozice optimalizováno s ohledem na všechna další přímá sousedství v daném schématu semenného sadu. Jako přímá sousedství je zde ve všech případech zvažováno pouze osm nejbližších pozic (dvě horizontální, dvě vertikální a čtyři diagonální). Všem těmto osmi pozicím je v rámci schématu přiřazena stejná váha. Za ideální je považován stav, když spolu všechny klony přímo sousedí se stejnou četností. Tomuto stavu se přibližujeme minimalizací kritériální funkce, která je definována jako rozptyl počtů přímých sousedství mezi všemi možnými dvojicemi přítomných klonů. Pokud je tento rozptyl roven 0, pak je teoreticky dosaženo ideálního řešení. Pro eliminaci přímých sousedství mezi rametami téhož klonu je v kritériální funkci zahrnut parametr penalizace ( $p$ ) tohoto typu sousedství. V dalších dále prezentovaných publikacích byl ONA použit pro řešení specifických zadání, jako je doplňování stávajících výsadeb a kombinování s dalšími designy pro tvorbu schémat semenných sadů (Chaloupková a kol. 2019) a genetická probírka (Chaloupková a kol. 2022). Pro všechny prezentované nástroje byl uvažován čtvercový spon rozmístění klonů v semenném sadu. Všechny nástroje byly naprogramovány v jazyku R.

Teoreticky byla panmixie definována jako stav, kdy spolu všechny klony sousedí se stejnou četností, tj. rozptyl součtů přímých sousedství, napříč klony a všemi pozicemi, je minimální. Matematicky je možné tuto situaci popsat následující kritériální funkcí, optimální řešení pro konkrétní zadání pak hledáme minimalizací funkce:

$$\min \rightarrow \frac{1}{\binom{t}{2}} \sum_{vij \in C} \left( N_{ij} - \frac{N_g}{\binom{t}{2}} \right)^2 + \sum_{vi}^t N_{ii} * p \quad (1)$$

kde  $t$  značí počet klonů,  $ij$  je označení dvojice klonů,  $C$  je množina všech neuspořádaných dvojic  $ij$  o  $\binom{t}{2}$  prvcích pro kterou tedy platí, že  $\{i, j\} = \{j, i\}$ ;  $i \neq j$ .  $N_{ij}$  je počet přímých sousedství na mříži páru klonů  $ij$ ,  $p$  je hodnota penalizace výskytu přímého sousedství ramet jednoho klonu,  $N_{ii}$  je počet přímých sousedství ramet jednoho klonu,  $N_g$  je počet přímých sousedství dané mříže. Ten lze vypočítat pro čtvercové a obdélníkové mříže jako

$$N_g = k * (l - 1) + l * (k - 1) \quad (2)$$

kde  $l$  je počet pozic v horizontálním směru a  $k$  je počet pozic ve vertikálním směru.  $N_{ii}$  je počet přímých sousedství na mřížce ramet klonu  $i$  (Chaloupková 2019).

#### 4.1. Využití ONA při tvorbě schémat semenných sadů

Při tvorbě zcela nového schématu semenného sadu jsou hlavními vstupními parametry vektor všech klonů určených k rozmístění a matice definující plochu semenného sadu. Dále je možné zvolit mezi systematickým a náhodným vyplňováním pole sadu a počtem iterací tvorby schématu (lokální heuristické řešení). Výstupem optimalizace jsou samotné schéma semenného sadu, matice počtů přímých sousedství ve výsledném schématu a hodnota kritériální funkce pro toto schéma. Samotný proces optimalizace spočívá v postupném obsazování pozic v sadu. Při zahájení procesu je vybrána první pozice, na níž je dosažen náhodně vybraný klon. Na další pozici je vybrán právě ten klon, po jehož umístění je dosaženo nejnižší hodnoty kritériální funkce. V případě stejné hodnoty pro více klonů je mezi nimi vybráno náhodně. Takto je postupně vyplněna celá mřížka sadu. Tvorba schématu je iterativní proces a počet zvolených iterací definuje, kolik takovýchto schémat je vytvořeno a vzájemně porovnáno.

Při tvorbě ONA schématu sadu je nutné zohlednit, zda pracujeme s klony o stejné velikosti, tj. zda jsou všechny klony zastoupeny stejným počtem ramet. V případě stejných velikostí je zvolen systematický způsob vyplňování mřížky sadu, kdy je postupováno po řádcích. V případě nevyrovnaných velikostí klonů je zvolen náhodný postup vyplňování mřížky sadu, kdy je každá další pozice pro dosažení klonu vybírána náhodně. Pro neobdélníkové, či jinak nepravidelné tvary semenných sadů je možné upravit vstupní matici mřížky sadu. Úpravou téže matice je možné ponechat některé pozice v sadu zcela volné.

Pro publikování efektivitu ONA při tvorbě schémat semenných sadů bylo vytvořeno celkem sedm schémat shodných velikostí a tvarem sadu (400 pozic, čtvercový tvar), avšak lišících se počty, a tedy i velikostí klonů. Šest z nich zahrnovalo vyrovnané velikosti klonů. Konkrétně se jednalo o zadání zahrnující 4 klony po 100 rametách, 5 klonů po 80 rametách, 8 klonů po 50 rametách, 10 klonů po 40 rametách, 20 klonů po 20 rametách a 40 klonů po 10 rametách. Jedno zadání zahrnovalo nevyrovnané velikosti klonů, kdy bylo 32 klonů rozděleno do 3 skupin. 10 klonů mělo velikost 20, 18 klonů mělo velikost 10 a 4 klony měly velikost 5. Každé ze schémat bylo optimalizováno pomocí 30 iterací. Pro zadání s nevyrovnanými velikostmi klonů bylo použit náhodný postup vyplňování sadu.

## 4.2. Hodnocení kvality ONA schémat

Obecná funkčnost ONA algoritmu byla v počátku práce testována na velkém množství teoretických zadání. Zadání se vzájemně lišila vstupními parametry a kombinacemi těchto parametrů. Byla testována jak zadání simulující podmínky v lesnickém praxi, tak extrémní situace, ke kterým může dojít při tvorbě sadu pouze hypoteticky. Funkčnost algoritmu tedy byla ověřena napříč různými počítačovými situacemi.

Pro objektivní posouzení kvality výsledného schématu je možné vypočítat teoretický minimální rozptyl hodnot v matici přímých sousedství pro schéma o daném počtu pozic a velikostech klonů. Vstupními parametry výpočtu teoretického minimálního rozptylu jsou matice definující plochu semenného sadu a vektor udávající počty ramet zastoupených klonů. Je vypočítán teoretický ideální počet přímých sousedství každé možné dvojice klonů a následně pomocí základní kritériální funkce i samotný teoretický minimální rozptyl. Tento výpočet je součástí základního kódu R. Tuto referenční hladinu je vhodné použít pro jednoduché typy zadání a byla uplatněna v počáteční fázi testování funkčnosti ONA.

Pro účely publikování výsledků práce (Chaloupková a kol. 2016) byl ONA algoritmus porovnáván i s dalšími designy, konkrétně s COOL designem (El-Kassaby a kol. 2014) a MI designem (Lstibůrek a El-Kassaby 2010; Lstibůrek a kol. 2015). Dále byla ONA schémata porovnávána i se zcela znáhodněnými schématy vytvořenými na základě stejných vstupních parametrů (velikost a tvar sadu a počet a velikost klonů). Pro vzájemné porovnání výsledných schémat byly použity parametry  $d_{min}$  (Lstibůrek a El-Kassaby 2010; Lstibůrek a kol. 2015) a  $\sigma^2_{min}$  (Chaloupková a kol. 2016), kde parametr  $d_{min}$  vyjadřuje míru potenciálního inbreedingu a parametr  $\sigma^2_{min}$  udává kvalitu schématu z pohledu možnosti dosažení panmixie. Čím nižší je parametr  $d_{min}$ , tím nižší je riziko inbreedingu. Nízké hodnoty  $\sigma^2_{min}$  odkazují na nízkou variabilitu mezi počty přímých sousedství mezi přítomnými klony a vysokou panmixii křížení. Pro výpočet těchto parametrů byl použit originální R kód (příloha dizertační práce). Jako referenční hladina pro zmíněné parametry (100%), byl pro všechna zadání použit znáhodněný design (resp. průměrné charakteristiky znáhodněného schématu replikovaného 100 nezávislými stochastickými iteracemi).

## 4.3. Tvorba hybridních schémat

ONA lze díky své univerzálnosti kombinovat s jakýmkoli dalším designem. Pro takový typ designu byl zaveden termín hybridní design. Při tvorbě hybridního schématu je prvním krokem

vytvoření schématu, které zahrnuje klony rozmístěné pomocí vybraného, doplňujícího algoritmu. ONA tak byl v rámci publikované práce kombinován s MI designem (Chaloupková a kol. 2019). MI design je vhodné použít pro zakládání sadů vyšších generací. Hybridní schéma tak může kombinovat příbuzné klony, kteří jsou rozmístěni pomocí MI designu a nepříbuzné, kteří jsou rozmístěni pomocí ONA.

Vstupními parametry MI designu jsou dvě matice, které označujeme **C** a **D**. Matice **C** definuje míru příbuznosti mezi klony a matice **D** vzdálenosti mezi všemi dvojicemi pozic v daném schématu. Pro vytvoření těchto vstupů jsou využity rutiny MS Excel a R podle Lstibůrka a kol. (2015). Vstupními parametry pro vytvoření MI schématu jsou dále počet iterací a požadovaný spon. Příbuzní jedinci jsou rozmístěni do zjednodušeného schématu, tak aby byl parametr  $d_{min}$  minimalizován. Toto schéma je následně přizpůsobeno skutečným rozměrům zadané mřížky sadu. V dalším kroku jsou předdefinované pozice doplněny o zbylé, nepříbuzné klony pomocí ONA designu. Vstupní parametry a postup vyplňování jsou v tomto případě totožné jako u standardního vytváření schématu. ONA do optimalizace zahrnuje sousedství mezi klonovými řadami a nepříbuznými klony. Výstupem procesu je schéma semenného sadu a matice přímých sousedství zahrnující i předdefinované pozice. Dále pak samotná hodnota kritériální funkce, která je v tomto případě zkrácena zahrnutím sousedství příbuzných klonů, jejichž rozmístění záměrně neodpovídá požadavku na maximální panmixii designu. V teoretické části výzkumu byly možnosti kombinování ONA s částečně předdefinovanými schématy mřížky sadu ověřovány na různých zadáních.

V již publikované případové studii využití hybridního schématu (Chaloupková a kol. 2019) byl MI design použit ve formě klonových řad. V sadu bylo rozmístěno celkem 20 nepříbuzných klonů o vyrovnaných velikostech a 2 klony, u nichž byl předpoklad příbuznosti. Sad zahrnoval celkem 666 pozic a byl nepravidelného tvaru se čtvercovým sponem. Pro rozmístění příbuzných klonů byla zvolena forma klonových řad čítajících 5 pozic. Pro vytvoření MI designu byly testovány různé poměry váhy negativně asortativního rozmístění (matice **C**), jak v rámci klonů (25, 50), tak mezi příbuznými klony (12, 50, 75, 80, 85). Tyto poměry určují poměr intenzity separace mezi rametami jednotlivých klonů a mezi těmito klony. Takto vzniklá schémata byla následně doplněna ONA designem. Bylo použito pravidelné doplňování mřížky sadu a proběhlo 100 nezávislých iterací. Výsledné schéma bylo použito pro založení semenného sadu Douglasky tisolisté (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco.) v rámci šlechtitelského programu zaměřeného na produkci vánočních stromků pro North Carolina State University (spolupráce s profesorem Johnem Framptonem).

#### 4.4. Doplnování existujících výsadeb pomocí ONA

ONA je možné využít pro doplnění stávajících výsadeb, kde v průběhu času dochází k mortalitě některých klonů. V takovém případě je vstupním parametrem do optimalizace matice aktuálního stavu semenného sadu s příslušnými klony označenými jejich identifikačními čísly. Dále je pracováno s vektorem ramet (opět značení identifikačními čísly), které mají být na volné pozice doplněny. Počet prvků vektoru musí odpovídat počtu prázdných pozic v matici sadu. Opět je nutné zvolit způsob vyplňování prázdných pozic a požadovaný počet iterací. Samotný proces optimalizace prostorového rozmístění vybraných klonů opět probíhá postupně, po jednotlivých pozicích a s ohledem na již existující sousedství v původní matici sadu. Jedná se o iterativní proces a nejlepší schéma z pohledu celkové panmixie je vybráno z řady výsledků, kdy za optimální schéma je požadováno takové, které dosahuje minimální hodnoty kritériální funkce, resp. rozptylu. K posouzení kvality nalezeného řešení je možné využít teoretického minima (analytické odvození v Chaloupková et al. 2016). Výstupy procesu jsou výsledné schéma, matice počtu přímých sousedství mezi všemi klony přítomnými v sadu pro toto schéma a výsledná hodnota kritériální funkce pro dané schéma. Pro tento typ úlohy bylo na modelových příkladech důsledně zkoumáno, zda je z pohledu optimalizace vhodné vybrat náhodné či systematické doplňování prázdných pozic.

V publikované případové studii, zabývající se doplněním již existujícího sadu (Chaloupková a kol. 2019), byl tento způsob využití ONA demonstrován na semenném sadu jedle bělokoré (*Abies alba* Mill.), který je v majetku Vojenské lesy a statky ČR, s.p. Jednalo se o čtvercový sad s 225 pozicemi se čtvercovým sponem. V sadu bylo 46 prázdných pozic do kterých bylo doplněno 11 různých klonů o různé velikosti v závislosti na jejich dostupnosti (3 až 9 ramet na klon).

#### 4.5. Genetická probírka na bázi ONA algoritmu

Na principu optimalizace počtu přímých sousedství mezi klony pracuje i ONA genetická probírka pro semenné sady lesních dřevin. Minimalizací kritériální funkce ONA algoritmu je pro výsledné schéma dosaženo co nejnižšího rozptylu počtu přímých sousedství mezi všemi přítomnými klony. Zároveň je zajištěna separace ramet v rámci klonů v požadované míře.

Vstupem tohoto algoritmu je schéma semenného sadu určeného pro genetickou probírku. Toto schéma je zadáno ve formě matice. Dále pak rozměry matice přímých sousedství určené všemi možnými kombinacemi klonů. Vektor, který je výčtem všech ramet, které mají být



odstraněny (**REMOVE**). Klony určené k odstranění musí být značeny identicky, jako ve vstupní matici semenného sadu. Dále je vstupem sekvence čísel (random seed) pro iniciaci generátoru náhodných, případně penalizace přímých sousedství.

V prvním kroku algoritmu je vytvořena matice všech existujících sousedství. Z **REMOVE** je vybrán nejčetnější (největší) klon a je označen jako *candidate*. Pokud existuje více klonů se stejnou četností, pak proběhl náhodný výběr mezi těmito klony. Na základě hodnot v matici sousedství je určeno se kterým klonem sousedí *candidate* s nejvyšší četností (*cy*). Pro dané schéma jsou vyhodnoceny všechny možnosti odstranění klonu ve vektoru Candidate, který sousedí s *cy*. Eliminací sousedství *candidate* a *cy* se snížila variabilita přímých sousedství. Ze schématu je tak odstraněn právě ten prvek z vektoru *candidate*, který sousedí s *cy* a zároveň jeho odstranění nejvíce snížilo hodnotu kritériální funkce. Tato konkrétní rameta je tedy odstraněna s ohledem na všechna ostatní již existující přímá sousedství. Postupně jsou, s ohledem na velikosti klonů, ze schématu odstraněny všechny deklarované ramety.

Hlavním výstupem je datový soubor, který obsahuje schéma po odstranění klonů uvedených v *remove*. Zároveň je zde uvedena hodnota kritériální funkce pro příslušné výsledné schéma. Druhým výstupem je matice **PAIRS**, ve které jsou vyčíslena přímá sousedství mezi všemi klony ve výsledném schématu.

Pro účely publikování této metody v rámci výstupu Chaloupková a kol. (2022), byl zvolen následující postup. Vstupními schématy pro genetickou probírku byl simulovaný klonový semenný sad. Design simulovaného sadu byl zvolen ONA (Chaloupková et al. 2016) a znáhodněné schéma. V prvním kroku byla vytvořena samotná vstupní schémata semenného sadu pomocí 100 iterací ONA. Schéma zahrnuje 40 klonů o vyrovnané velikosti 10 ramet. Tvar schématu je čtvercový a zahrnuje 400 pozic se čtvercovým sponem. Pomocí normálního, standardizovaného rozdělení ( $\mu=0$ ,  $\sigma^2=1$ ) byly simulovány šlechtitelské hodnoty všech 40 klonů. Inferiorní klony pro provedení probírky byly vybrány dvěma způsoby, a to pomocí standardní vyrovnané probírky a pomocí metody Linear Deployment (LD) (Lindgren and Matheson 1986). Pro vyrovnanou probírku byla selekce prováděna vždy pouze ve skupině 20 klonů. Intenzita vyrovnané probírky se pohybovala mezi 5 až 40 procenty s intervalem 5. Vyšší intenzita probírky by vedla k odstranění všech ramet inferiorních klonů. V takovém zadání by tudíž nebyl prostor pro optimalizaci. Pro Linear Deployment byly klony vybrány s použitím LD nástroje s ohledem na zvolenou intenzitu probírky (Lindgren and Matheson 1986). Metoda Linear Deployment vybírá klony úměrně k jejich šlechtitelské hodnotě. Parametry genetické probírky jsou šlechtitelská hodnota, požadovaná výsledná efektivní velikost populace, množství klonů a ramet (Lindgren and Matheson 1986). Různá selekční intenzita byla v tomto případě

upravována pomocí směrnice přímky ( $b$ ). Konstantní člen v regresní závislosti ( $g_0$ ) byl nastaven defaultně jako -2,27, což odpovídá nejnižší simulované šlechtitelské hodnotě daného souboru klonů. Pro Linear Deployment byl použit nástroj, LINEAR DEPLOYMENT 2006 (Lindgren 2006). Pro optimální odstranění konkrétních ramet v rámci definovaného schématu, daného způsobu a intenzity selekce byl následně použit výše popsany ONA algoritmus. Tato optimalizace tedy proběhla celkem pro různých 18 scénářů (Tab. 1). Dále byla metoda genetické probírky demonstrována na již existujícím semenném sadu. Jednalo se o sad borovice lesní (*Pinus sylvestris* L.) v majetku státního podniku Lesy ČR, konkrétně o sad Doubrava na lesní správě Plasy. Tento sad byl založen v roce 1980 pomocí jednoduché randomizace se čtvercovým sponem na ploše 6,5 ha. V sadu bylo před probírkou přítomno 1165 ramet od 87 klonů. Velikosti klonů byly značně nevyrovnané, v rozmezí od 1 do 28 ramet. Byly využity známé šlechtitelské hodnoty z provedených testů polosesterských potomstev (Kaňák 2011). Pomocí Linear Deployment algoritmu byly určeny optimální velikosti klonů pro probírku (Lindgren a Matheson 1986). Následně byla provedena genetická probírka pro 8 různých scénářů selekční intenzity od 5 do 40 procent (5% interval).

Všechna vstupní i výsledná schémata byla následně hodnocena pomocí R balíčku OrchSTAT. Jako referenční hladina tak byly pro každé schéma použity průměrné hodnoty sledovaných parametrů znáhodněného schématu.

Ve fázi vývoje byla optimalizace průběžně testována na dalších typech zadání, která zde nejsou uvedena specificky.

**Tab. 1.** Specifika scénářů, na kterých byla testována ONA genetická probírka v rámci publikace Chaloupková a kol. (2022). LD značí Linear Deployment.

Scénář	Metoda výběru klonů	Intenzita probírky (%)	Odstraněných ramet	Počet genotypů zahrnutých do probírky
1	vyrovnaný	5	20	20
2	vyrovnaný	10	40	20
3	vyrovnaný	15	60	20
4	vyrovnaný	20	80	20
5	vyrovnaný	25	100	20
6	vyrovnaný	30	120	20
7	vyrovnaný	35	140	20
8	vyrovnaný	40	160	20
9	vyrovnaný	45	180	20
10	LD	5	20	3
11	LD	10	40	10
12	LD	15	60	16
13	LD	20	80	21
14	LD	25	100	22
15	LD	30	120	26
16	LD	35	140	28
17	LD	40	160	34
18	LD	45	180	36

#### 4.6. Asortativní křížení s využitím ONA

Asortativní neboli preferenční křížení může být negativní nebo pozitivní. Jeho využití je teoreticky možné při vysoké specifické kombinační schopnosti mezi superiorními genotypy, nebo při zakládání semenných sadů vyšších generací, kdy je žádoucí do určité míry eliminovat sousedství příbuzných klonů. Další výhodou je navýšení aditivního genetického rozptylu (Lstibůrek et al. 2005) v případě pozdějšího využití testovacích výsadeb při pozdější aplikaci strategií BWB (El-Kassaby a Lstibůrek 2009). V rámci upraveného ONA algoritmu je možné zahrnout teoreticky jak pozitivní, tak negativní (které nejspíš nenajde praktické uplatnění) asortativní křížení a vytvářet tak schémata vhodná pro zakládání semenných sadů vyšších generací. Může být alternativou ke tvorbě výše zmíněných hybridních schémat. Tento nástroj nebyl dosud publikován, ale jeho fungování bylo prověřeno na řadě zadání. Dále je představen na vybraném modelovém příkladu semenného sadu.

Vstupními parametry optimalizace jsou vektor zahrnující klony a jejich velikosti, matice mřížky sadu a matice definující míru požadované preference křížení mezi všemi možným

dvojicemi klonů. Dále počet nezávislých iterací, způsob vyplňování mřížky sadu, sekvence generátoru náhodných čísel a váha penalizace sousedství v rámci klonů. Hlavními výstupy optimalizace jsou schéma semenného sadu a matice počtů přímých sousedství pro výsledné schéma, která tato sousedství vyčísluje včetně zahrnuté míry preference dané kombinace klonů. Dále je to hodnota kritériální funkce pro dané schéma. Optimalizace vychází ze základního ONA algoritmu, včetně shodné kritériální funkce. Všechny pozice v sadu jsou postupně vyplňovány s ohledem na již existující dvojice a zadanou hodnotu preference křížení pro danou kombinaci klonů.

Pro demonstraci je zde představeno jednoduché zadání čítající 10 klonů o shodné velikosti 6 ramet na klon. Sad má 60 pozic a je obdélníkového tvaru a čtvercového sponu. Byly vybrány 2 dvojice klonů (ID1 a ID2 jako první dvojice a ID3 a ID4 jako druhá dvojice), kterým byly v rámci 6 různých scénářů přidělovány různé hodnoty jejich přímého sousedství (Tab. 2). Mřížka sadu byla doplňována náhodným výběrem pozic a pro každé zadání proběhlo 300 nezávislých iterací.

**Tab. 2.** Parametry šesti scénářů, na kterých byl demonstrován nástroj pro zahrnutí asortativního křížení u základního ONA algoritmu. ID1/ID2 a ID3/ID4 značí dvě dvojice klonů, pro které byly definovány různé hodnoty penalizace jejich přímých sousedství při tvorbě schématu.

Scénář	ID1/ID2	ID3/ID4	Ostatní klony	Počet iterací
1	0,1	0,5	1	300
2	0,5	1	1	300
3	1,5	1	1	300
4	2	1,5	1	300
5	0,5	1,5	1	300
6	1	1	1	300

## 5. Výsledky

Dále jsou prezentovány výsledky tří prvoautorských vědeckých publikací a další dílčí výsledky práce související s nástroji ONA.

### 5.1. Optimum Neighborhood Seed Orchard Design

V rámci této publikace byly prezentovány možnosti tvorby semenných sadů pomocí ONA algoritmu. Ze 7 vytvořených schémat zde byla vybrána 2, a ta byla graficky zobrazena. V prvním modelovém zadání se jednalo o sad čítající 400 pozic čtvercového tvaru o 40 klonech o velikosti 10 ramet. Velikosti klonů byly v tomto případě vyrovnané. Ve výsledném schématu nebyl vizuálně shledán žádný opakující se vzor. Algoritmus zajistil stoprocentní separaci ramet téhož klonu. Toto schéma je zobrazeno graficky ve Fig. 1. Další výsledná schémata pro zadání čítající menší množství klonů o větších velikostech již vykazovaly určitý systém v uspořádání. Zároveň vedly, v závislosti na počtu klonů, k výskytu sousedství mezi rametami téhož klonu. Druhý zobrazený scénář zahrnoval nevyrovnané velikosti klonů, konkrétně skupiny o velikostech 20, 10 a 5 ramet na klon. Jednalo se opět o sad o 400 pozicích čtvercového tvaru. Zajímavým výstupem je fakt, že průměrný počet sousedících pozic (odvozený z výsledné matice počtů přímých sousedství), je pro každou tuto skupinu klonů jiný. To indikuje skutečnost, že tento parametr závisí na velikosti klonu. Ve výsledném schématu opět nebyla vizuálně patrná žádná systematickosti v rozmístění klonů. Zároveň se zde nevyskytovala žádná přímá sousedství mezi rametami téhož klonu. Schéma je zobrazeno graficky ve Fig. 2.


Výsledky porovnávající 4 vybraná zadání s vyrovnanými velikostmi klonů pomocí parametrů  $var_{min}$ , pro dané schéma ( $\sigma^2_{min}$ ) a teoretického minimálního rozptylu ( $\sigma^2_{theormin}$ ), jsou zobrazeny v grafu (Fig. 3). Graf zobrazuje, že s rostoucím počtem klonů a jejich klesající velikostí se výsledný design přibližuje teoretickému optimu (parametr  $var_{min}$  klesá). Opačně na rostoucí velikost klonů reaguje teoretický minimální rozptyl. Ten v takovém případě postupně roste.

Výsledky hodnocení vytvořených schémat a jejich porovnání s dalšími schématy pomocí parametrů  $d_{min}$  a  $var_{min}$  jsou ve výstupu zobrazeny v tabulce 1. a také graficky ve Fig. 4 a Fig. 5. V tabulce jsou pro tyto parametry uvedeny hodnoty absolutní, v grafech poté hodnoty relativní, kdy randomizované schéma odpovídá 100%. V tabulce je patrný významný rozdíl v parametru  $var_{min}$  mezi schématy s vyrovnanými a nevyrovnanými velikostmi klonů, což je

způsobeno samotným definováním kritériální funkce. To logicky vyplývá z hodnot počtů přímých sousedství ve výsledných schématech. Ta zobrazují graficky matice počtů přímých sousedství, které jsem uvedeny jako Fig. 7 a Fig. 8. Dále je z tabulky zřejmé, že MI design dosahuje nejlepších hodnot pro parametr  $d_{min}$  a ONA design pro parametr  $var_{min}$ . To odpovídá způsobu, jakým jsou definovány kritériální funkce těchto designů. Z grafu Fig. 4 je patrné, že ONA překonává COOL pro parametr  $d_{min}$ , což může být považováno za další benefit tohoto designu. Ve srovnání s COOL zde tedy dochází při použití ONA k lepší separaci ramet téhož klonu. V případě nevyrovnaných velikostí klonů (Fig. 5) již tento rozdíl mezi ONA a COOL není patrný. Pro vyrovnané velikosti klonů vychází parametr  $var_{min}$  významně nejnižší pro ONA schéma (Fig. 4). Stejně tak tomu je pro nevyrovnané velikosti klonů (Fig. 5). Zde je navíc patrný významný rozdíl i mezi COOL a MI designem.

Výsledky ukazují, že hodnota jakkoli definované kritériální funkce pro výsledné schéma je přímo závislá na specifikách konkrétního zadání. Především na počtu a velikostech klonů a velikosti a tvaru schématu. Lze konstatovat, že klony s nižším zastoupením jsou obecně umisťovány do středu schématu, čímž se zvyšuje jejich uplatnění při reprodukci a je podporována panmixie (Fig. 6, 7 a 8).

## Optimum neighborhood seed orchard design

Kateřina Chaloupková<sup>1</sup> · Jan Stejskal<sup>1</sup> · Yousry A. El-Kassaby<sup>2</sup> · Milan Lstibrek<sup>1</sup> 

Received: 7 July 2016 / Revised: 25 September 2016 / Accepted: 4 October 2016  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

**Abstract** Original seed orchard algorithm “Optimum Neighborhood Seed Orchard Design” was developed as local heuristics to facilitate the establishment of advanced-generation seed orchards with complex configurations. The scheme leads to uniform spatial distribution among adjacent genetic entries, promoting panmixia. The resulting scheme is thus suitable to establishing both productive seed orchards as well as clonal archives of threatened species, etc. Further, it can accommodate variable clonal sizes, uneven grids, relatedness, assortative mating. It may supplement existing layouts (clonal rows, etc.). Layouts outperformed existing advanced-generation alternative schemes in most parameters and thus could be recommended to operational forestry and gene conservation management.

**Keywords** Seed orchard designs · Spatial arrangements · Panmixia · Clonal adjacency

---

Communicated by: J. Beaulieu

✉ Milan Lstibrek  
lstiburek@fd.czu.cz

<sup>1</sup> Department of Genetics and Physiology of Forest Trees, Faculty of Forestry and Wood Sciences, Czech University of Life Sciences, 165 21 Prague 6, Czech Republic

<sup>2</sup> Forest Sciences Centre, Faculty of Forestry, 2424 Main Mall, Vancouver, BC V6T 1Z4, Canada

### Introduction

Seed orchards are the production vectors linking tree improvement activities with reforestation practices. The main objective of a seed orchard is to produce frequent and abundant high genetic quality seed for the production of genetically improved seedlings for regeneration. The mating pattern within a seed orchard is a major player in determining the level of inbreeding and is mainly influenced by clonal genealogy, size, reproductive phenology, gametic contribution, propensity to selfing, spatial arrangement on orchards’ grids, and the extent of extraneous gene flow (El-Kassaby 1995; Burczyk and Prat 1997).

Seed orchard designs have evolved from those focused on randomization for maximizing mating among unrelated clones such as the completely random (Giertych 1975) and permuted neighborhood (Bell and Fletcher 1978), to those dealing with advanced generation orchards for avoiding mating among relatives, promoting assortative mating, and minimizing inbreeding (randomized complete block (White et al. 2007); replicated randomized staggered clonal rows (R<sup>2</sup>SCR) (El-Kassaby et al. 2014); minimum inbreeding design (MI) (Lstibrek and El-Kassaby 2010; Lstibrek et al. 2015)).

The spatial arrangement of clones on the orchard’s grid is, by far, among the most important factors affecting not only the mating pattern but also the level of assortative mating which is, sometimes, advocated by breeders for capturing both additive and non-additive genetic variances controlling selected traits. The R<sup>2</sup>SCR and MI designs focused on the frequency of clonal adjacency and its impact on panmixia. Here, we present a new and simple algorithm that

specifically deals with clonal adjacency and its optimization. The proposed algorithm is based on heuristics, which is expected to effectively allow the discovery of optimum orchard's arrangement through the "trial-and-error" method, even under complex scenarios. The efficiency of the proposed algorithm is demonstrated and compared to those designs developed for managing clonal adjacency; namely, R<sup>2</sup>SCR and MI designs. The algorithm was developed in R system (R Development Core Team 2008) and is publicly available (Lstibůrek 2016).

## Methods

### Optimum neighborhood algorithm (ONA)

We assume an orchard grid with  $m$  and  $n$  dimensions, it consists of sliding  $3 \times 3$  rectangular neighborhoods with the target clone located centrally (i.e., every ramet is surrounded by 8 positions). We considered the "optimum neighbourhood" as the arrangement that produces a minimum variance of the number of times (i.e., counts) of adjacency between two different clones. This arrangement is a practical proxy of panmixia as the variance of counts reaches zero when all adjacency counts are equal. It is conceivable that a solution is reached (i.e., minimum variance) where incident adjacency between some clones exist.

### Mathematical solution

Let  $V$  be the square symmetric matrix of sums of adjacency among clones with the dimension  $N_c$  (i.e., the number of clones). We optimize the following criterion function, which comprises of two addends:

$$\min \rightarrow \frac{1}{\binom{N_c}{2}} \sum_{i=1}^{N_c} \sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^{N_c} \left( N_{ij} - \frac{N_g}{\binom{N_c}{2}} \right)^2 + \sum_{i=1}^{N_c} N_{ii} p, \quad (1)$$

where  $N_{ii}$  and  $N_{ij}$  depict the number of single and different clones' adjacency, respectively,  $N_g$  is the total number of neighboring positions existing within the rectangular orchard grid which can be calculated as

$$N_g = m(n-1) + n(m-1) + 2(n-1)(m-1). \quad (2)$$

The first addend in Eq. 1 represents the variance of upper triangle counts in  $V$  and the second addend represents a penalty ( $p$ ) implemented to limit same clone adjacency (diagonal counts in  $V$ ). Potential value of  $p$  is of higher order compared to the first addend (ex. 10 or 100), which leads to an effective elimination of direct neighborhoods of same genetic entries. Value of the criterion function

(later designated as  $\sigma_{min}^2$ ) is therefore, in ideal case, equal only to the first addend.

### Proposed heuristics to optimize a given orchard design

The first step is to create an empty  $V$  matrix followed by selecting the first position on the orchard grid (see a graphical representation of the proposed heuristic algorithm in Fig. 6). On the selected position, a genetic entry is randomly drawn out of all available candidate entries (the ramet population of all clones) and the selection of the second and subsequent positions are made after evaluation by the criterion function (Eq. 1). At each step, the criterion function is maintained at minimum after considering all possible candidate entries and this position is assigned and the process is sequentially repeated until the entire orchards grid is fully populated. This process considers all candidate entries (clonal representation) in case of equal or unequal clone size through a candidate entry vector. Therefore, even under different clone sizes, the random selection of candidate entries is proportional to their respective clone size.

### Reference level for evaluating the resulting arrangement

The resulting orchard arrangement is compared to a theoretical minimum variance "reference" to validate the effectiveness of the heuristics as well as the impact of the penalty  $p$  on the minimization of variance (Appendix).

### Presented examples

Seven different scenarios were constructed to assess the efficiency of the proposed orchard layout. Six included balanced clonal size (100, 80, 50, 40, 20 and 10 ramets per every clone), and one unbalanced clonal size (10, 18, and 4 clones with 20, 10 and 5 ramets per clone, respectively). The orchard grid is square and contains 400 positions (i.e.,  $20 \times 20$ , in all cases). Optimum solution for each assignment was generated within 30 iterations, and the assigned  $p$  value (penalty) was 100.

### Comparison to existing designs

The resultant orchard layouts were compared to (R<sup>2</sup>SCR) (El-Kassaby et al. 2014) and MI designs (Lstibůrek and El-Kassaby 2010; Lstibůrek et al. 2015). To generalize the comparisons, balanced and unbalanced designs were investigated. The balanced design consisted of 40 clones with 10 ramets each and the unbalanced design consisted of using 10, 18, and 4 clones, each is represented by 20, 10, and 5 ramets, respectively. Additionally, as a reference, a completely randomized layout (RD) was also generated. Results



from the different schemes were evaluated by  $d_{min}$  and  $\sigma_{min}^2$ , where  $d_{min}$  is a proxy to potential inbreeding (selfing in this case) termed as “minimum distance” estimate:

$$d_{min} = \sum_{l=1}^{N_c} \sum_{i=1}^{N_k} \sum_{j=i+1}^{N_k} \frac{1}{d_{il,jl}^2}, \tag{3}$$

where  $d$  is the distance between the  $i^{th}$  and the  $j^{th}$  ramet of the  $l^{th}$  clone,  $N_c$  is the number of clones, and  $N_k$  is the number of ramets within a clone. The  $d_{min}$  represents the inverse sum of squares of all possible distances between any two ramets of the same clone and across all clones. The closer the distance between any two ramets of the same clone, the higher the value and, conversely, the further the distance, the lower the value (Lstibůrek and El-Kassaby 2010).

**Results and discussion**

The proposed Optimum Neighborhood Algorithm (ONA) seed orchard layout proved efficient in minimizing the variance of the  $V$  matrix under both balanced and unbalanced clonal sizes.

**Balanced clonal size**

The balanced clone size of 40 clones each with 10 ramets is illustrated in Fig. 1 along with the corresponding  $V$  matrix (Fig. 7). In this scenario, we did not detect any specific geometrical pattern, suggesting efficient distribution of ramets on the orchard’s grid. The local separation zone of  $3 \times 3$  secured 100 % avoidance of having any two ramets of the

35	26	33	32	16	14	22	19	11	27	25	39	26	38	27	13	29	36	24	8
28	30	12	4	37	11	20	2	17	18	33	40	3	36	19	40	31	34	7	1
24	2	25	29	39	36	9	37	26	13	24	20	30	1	23	14	8	6	33	21
38	31	7	15	35	21	5	10	34	11	10	23	32	31	9	25	28	3	17	10
33	28	10	22	31	4	18	39	12	40	6	29	18	19	26	16	22	32	25	1
29	19	4	27	3	14	2	6	38	9	22	1	16	7	5	8	21	34	35	37
30	8	15	23	12	15	32	5	30	18	34	38	20	12	13	23	2	3	19	24
10	37	38	17	28	36	40	27	20	15	14	29	21	6	37	22	33	16	6	25
3	7	40	35	13	18	8	35	16	13	26	27	24	15	27	36	17	14	36	4
9	4	11	1	2	32	12	39	23	4	1	39	9	33	11	29	5	24	30	34
17	8	5	28	9	10	31	19	7	14	20	28	37	21	25	3	31	16	17	7
20	31	33	34	27	35	14	21	28	39	40	26	30	13	38	11	18	37	40	32
34	23	11	30	18	7	5	25	22	24	32	22	12	9	32	4	24	21	23	5
26	16	10	38	23	22	20	15	12	1	26	8	29	3	24	38	26	15	1	3
6	36	2	29	35	6	17	19	2	27	6	14	13	2	7	25	5	11	39	17
35	33	40	30	15	4	39	25	8	34	21	10	39	36	31	13	9	22	30	8
13	16	1	31	28	13	34	23	28	3	20	32	19	38	20	6	19	4	37	7
22	38	12	37	27	40	12	17	36	18	35	33	37	34	28	29	11	20	29	18
33	14	11	2	14	4	21	35	9	8	10	5	18	5	24	16	21	26	9	39
32	7	17	23	36	1	2	40	15	16	25	6	30	19	27	3	31	10	15	12

Fig. 1 Balanced scenario with 40 clones each with equal clonal size of 10 ramets/clone

4	5	10	16	24	3	9	15	27	7	5	7	2	1	9	3	6	9	7	2
21	32	27	17	8	32	5	2	21	19	25	20	26	13	15	10	12	24	19	6
26	15	18	10	6	14	3	17	14	23	3	5	18	24	3	25	1	5	3	31
7	13	23	7	5	2	1	5	29	10	7	8	20	27	1	11	8	13	21	10
32	4	27	4	16	23	6	7	8	4	18	11	10	13	8	4	14	16	14	6
16	25	28	1	26	5	9	1	24	19	30	6	24	12	7	20	9	4	22	12
6	3	14	18	4	22	10	25	17	1	26	27	9	25	22	5	17	20	3	7
15	1	24	2	9	3	21	28	24	9	29	7	5	31	18	11	23	7	1	17
8	28	9	21	10	7	9	29	5	6	25	16	1	2	27	7	1	2	28	6
26	23	20	28	2	14	1	24	4	1	18	19	29	3	16	30	6	3	7	19
20	6	27	1	16	9	5	10	23	10	15	20	12	23	22	13	23	8	28	5
8	13	5	8	26	11	8	1	8	4	24	16	6	8	9	18	28	1	13	2
6	9	30	31	21	3	7	22	6	2	10	7	21	19	32	1	10	20	12	25
19	3	20	1	8	30	10	15	14	28	30	12	4	12	11	4	32	31	14	26
23	2	10	4	3	9	2	8	7	4	10	5	15	3	1	22	28	7	3	15
4	5	25	17	18	8	22	24	2	9	15	16	18	12	27	19	15	11	29	18
6	3	13	21	6	25	26	17	4	8	17	11	9	14	8	17	31	4	22	2
4	11	5	10	20	27	10	19	5	7	12	27	10	19	25	2	13	9	6	10
23	12	6	22	14	11	2	13	22	2	4	26	8	4	10	9	17	4	16	9
2	8	28	5	3	26	6	11	21	1	3	21	9	5	2	7	8	6	3	2

Fig. 2 Unbalanced clone size scenario illustrating differently sized group (one clone per each group size is highlighted)

same clone in adjacent positions on the orchards grid. This is a product of the second addend in the criterion function (Eq. 1) and it seems that a penalty of  $p = 100$  was sufficient (i.e., all diagonal elements in the  $V$  matrix are equal to zero). From the above inspection, we highlight excessive optimization space under balanced scenarios with relatively large number of clones, accommodating larger, yet feasible

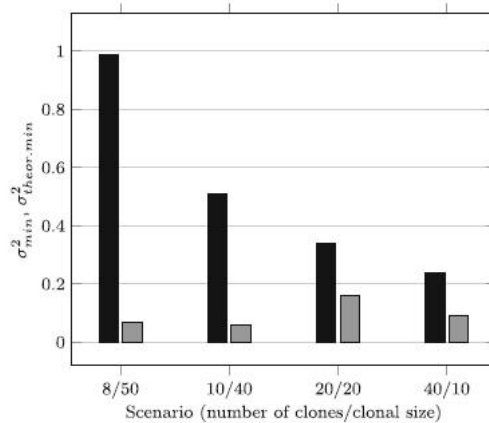


Fig. 3 Comparison of various scenarios (by criterion function value,  $\sigma_{min}^2$ , black columns) to a theoretical minimum variance “reference” ( $\sigma_{min}^2_{theor-min}$ , gray columns) for validating the heuristics’ effectiveness.  $\sigma_{min}^2$  and  $\sigma_{min}^2_{theor-min}$  were 3099.67 and 0, respectively, for scenario 4/100; and 12.09 and 0.16 for scenario 5/80 (data not shown)

**Table 1** The evaluated criteria values ( $d_{min}$  and  $\sigma_{min}^2$ ) for the optimum neighbourhood (ONA) with minimum inbreeding (MI), replicated randomized staggered clonal rows (R<sup>2</sup>SCR), and randomized (RD) schemes

	Balanced clonal size				Unbalanced clonal size			
	ONA	MI	R <sup>2</sup> SCR	RD	ONA	MI	R <sup>2</sup> SCR	RD
$d_{min}$	32.25	21.58	40.34	66.30	60.94	51.39	59.66	98.62
$\sigma_{min}^2$	0.24	2.26	1.63	5.04	3.85	14.94	5.54	40.92

The completely random layout was used as a reference value (100 %)

local separation zones. Reducing the clonal number results in a substantial increase of the clonal size (e.g., 4 clones and 100 ramets each) leading to less favorable scenarios (results not shown), where the layout shows repeated patterns and although the  $\sigma_{min}^2$  is minimized, there is no feasible solution to accommodate completely the second addend, i.e. diagonal elements in V matrix become larger than zero.

In the above scenarios,  $\sigma_{min}^2$  of the best heuristic solution was close to its theoretical minimum limit (Appendix); however, the presence of the additional constraint, i.e. separation zones, prevented its attainment, particularly under extreme scenarios (small number of clones and large clonal sizes).

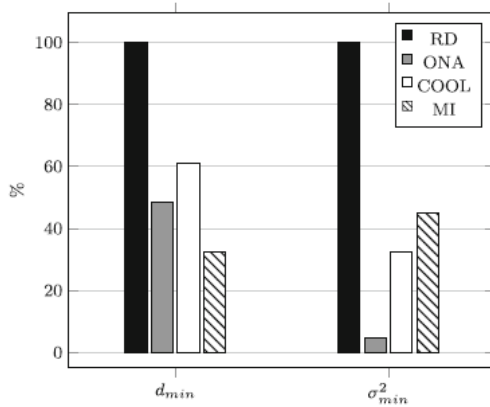
**Unbalanced clonal sizes**

The average number of neighboring positions for the clones is 7.23, 7.58, and 7.70 for the first (20 ramets/clone), second (10 ramets/clone), and third (5 ramets/clone) groups, respectively, indicating the presence of significant dependence of this parameter on clonal size. Resulting layouts

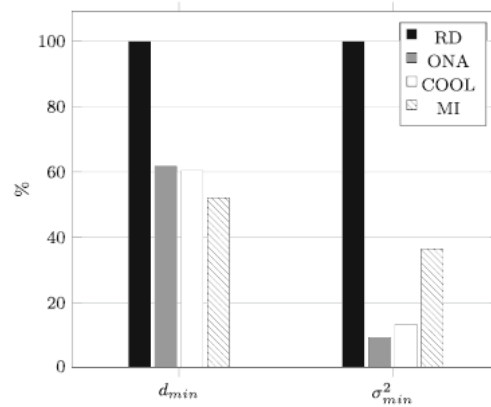
and V matrix are illustrated in Figs. 2 and 8, respectively. Similar to the balanced design observation, we conclude the absence of any geometrical specific patterns, suggesting even distribution of ramets within the grid. Additionally, the used local separation function of 3.85 did not result in any clonal adjacency on the orchard grid. While a visible shift exists, the results produced acceptable minimum variance for such exceedingly unbalanced scenario. Furthermore, the strength of the ONA scheme will be highlighted during its comparison with the other advanced designs (R<sup>2</sup>SCR and MI) as well as the random layout.

**Evaluation of resulting schemes by means of reference levels**

The evaluation of resultant balanced clonal contributions to the respective  $\sigma_{theor,min}^2$  is depicted graphically in Fig. 3, where the value of  $\sigma_{min}^2$  drops with higher  $N_c$  and asymptotically progresses towards  $\sigma_{theor,min}^2$ . For unbalanced clone



**Fig. 4** Relative comparison of optimum neighbourhood (ONA) with minimum inbreeding (MI), replicated randomized staggered clonal rows (R<sup>2</sup>SCR), and randomized (RD) designs using a balanced completely random layout



**Fig. 5** Relative comparison of optimum neighbourhood (ONA) with minimum inbreeding (MI), replicated randomized staggered clonal rows (R<sup>2</sup>SCR), and randomized (RD) designs using an unbalanced completely random layout

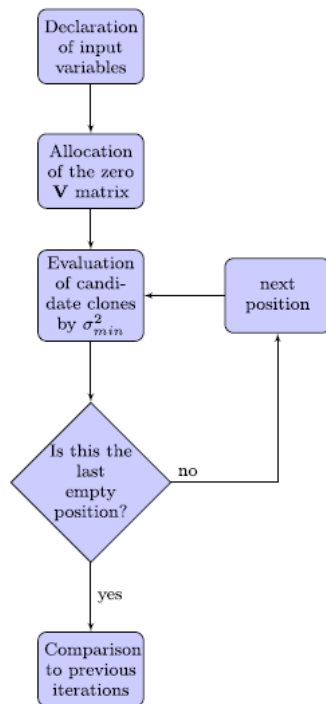


Fig. 6 Schematic description of the ONA's algorithm

sizes, the comparison resulted in  $\sigma_{min}^2 = 3.85$ , while  $\sigma_{theor.min}^2 = 3.39$  (data not shown in the graph).

#### Comparison of resulting ONA schemes with other designs by means of $d_{min}$ and $\sigma_{min}^2$

The observed differences of  $d_{min}$  and  $\sigma_{min}^2$  in R<sup>2</sup>SCR and MI schemes are relatively lower than that observed for the RD design, indicating these two designs' effectiveness in separating clonal ramets on the seed orchard grid (Table 1). The relative differences became more pronounced for the unbalanced design (Table 1 and Fig. 5). It must be emphasized that the MI outperformed the R<sup>2</sup>SCR and ONA based on  $d_{min}$ . However, it should be noted that the criterion function of MI design is built differently and focuses primarily at minimizing inbreeding.

It is clear that under balanced cases, the ONA outperformed R<sup>2</sup>SCR in terms of  $d_{min}$  and this could be considered as an added benefit to its primary efficiency in minimizing  $\sigma_{min}^2$  (Fig. 4). When considering  $\sigma_{min}^2$  as a key comparison criterion (a proxy of panmixia), the ONA is by far the best layout under the studies' assumptions. It is

worth mentioning that under unbalanced scenarios, the relative differences between the ONA and R<sup>2</sup>SCR schemes become marginal (Fig. 4 vs. Fig. 5).

The results show that the value of the objective function of the final scheme is closely related to the way of defining close proximity and the type of specific task (the number of clones and space for optimization as the size of the set). It should be noted that smaller clones are placed in the layout center, where the position stretches to the maximum number of direct neighborhoods (8), thereby enhancing their chances to participate in reproduction and thus supporting panmixia (Figs. 6, 7 and 8).

The current study provides a theoretical insight into seed orchard layout optimization. There are two theoretical limits underlying the spatial distribution, one provided by the completely randomized scheme (RD) where all restrictions are relaxed and all genetic entries are treated equally. Such a scenario, when averaged across large number of independent iterations, mimics what could be called a random mating (union of gametes). In a real situation, as shown in Figs. 4 and 5, this approach clearly lacks parameters desirable in optimum seed orchard layout. Clear disadvantage of simple randomization is the lack of separation among the same (ramets of the same clone) or similar (i.e., half-siblings) genetic entries. Second and equally important is the theoretical limit embodied by the MI layout, which is a global optimization protocol, leading to the minimum expected inbreeding (Lstibůrek and El-Kassaby 2010; Lstibůrek et al. 2015), but disregarding panmixia in its nature. The new ONA design is centered somewhere in between RD and MI with its ability to avoid any visible patterns in final scheme (promotion of panmixia) and to control direct neighborhood of the same genetic entries (Figs. 4 and 5). This study also highlights important factors relevant to seed orchards' designs specifically in advanced generations where higher selection differential (smaller number of clones are desired) inevitably leads to increase of common ancestry. As the MI design implies, attention is often directed to intentional selfing avoidance (large weight on separation of ramets of the same clone); however, as the number of clones goes down, this is accompanied by increase in the number of ramets per clone which adds additional levels of complexity. This problem could be further intensified by relatedness among clones or under unequal deployment. This additional complexity has to be dealt when the ONA approach is considered. The penalty value ( $p$ ) is an integral part of the criterion function and enables us to allocate extra weight to various levels of relationship. When the penalty is given a negative value, it can even promote assortative mating, which is, of course, a rather extreme scenario. Moreover, the criterion function can accommodate various natural constraints of the particular plot—for example, prevailing wind direction, slope etc.

Fig. 7 The balanced scenario V matrix (subset of the matrix is presented)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	.	.	Nc	
1	0	3	2	2	2	2	1	1	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	1	1	2	.	.	.
2	3	0	2	2	1	1	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	1	.	.	.
3	2	2	0	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	1	1	2	2	2	2	1	2	.	.	.
4	2	2	2	0	2	2	2	2	2	1	3	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	.	.	.
5	2	1	2	2	0	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	3	2	2	2	.	.	.
6	2	1	2	2	2	0	1	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	.	.	.
7	1	2	2	2	2	1	0	2	1	2	2	1	2	3	1	1	2	3	2	2	2	.	.	.
8	1	2	2	2	2	2	2	0	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	.	.	.
9	2	2	2	2	2	2	1	2	0	3	2	3	2	1	3	2	2	3	2	2	2	.	.	.
10	1	2	1	1	2	3	2	2	3	0	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	.	.	.
11	2	2	2	3	2	2	2	1	2	2	0	2	1	2	2	3	2	2	2	2	2	.	.	.
12	2	3	2	2	1	2	1	2	3	2	2	0	3	2	3	2	2	1	2	1	2	.	.	.
13	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	3	0	2	2	2	2	2	2	2	2	.	.	.
14	2	2	1	3	2	2	3	2	1	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2	2	2	.	.	.
15	1	2	1	2	2	2	1	2	3	2	2	3	2	2	0	2	2	1	2	2	2	.	.	.
16	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	3	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2	.	.	.
17	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	0	1	2	2	2	.	.	.
18	1	2	2	2	3	2	3	2	3	2	2	1	2	2	1	2	1	0	2	2	2	.	.	.
19	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	3	2	2	.	.	.
20	2	1	2	2	2	3	2	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	3	0	2	2	.	.	.
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Nc	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

In addition, the ONA can be used in combination with other existing layouts without losing its efficiency. We conducted a case study of ONA connected with predefined MI design of clonal rows (results not shown), where the ramets of the same clone were merged together in clonal-rows without imposing constraints on selfing (El-Kassaby 2003; El-Kassaby et al. 2007; El-Kassaby et al. 2014). This makes biological sense in some species as evidence of low selfing rates in conifers supports this notion (El-Kassaby 1995; O’Connell 2003). Clonal rows were assigned to those clones

sharing a common pedigree, and subsequently, distance of these related clones within the layout was maximized by MI. In the next step, ONA layout was literally wrapped around the optimized clonal rows.

The upper triangular matrix concept for defining all possibilities of outcrossing among clones in the seed orchard, which is partially equal to the V matrix utilized in the ONA algorithm, has been used before (Nester 1994); however, the V matrix has not been used as a design evaluation criteria, but already at the point of the layouts’ creation.

Fig. 8 The unbalanced scenario V matrix (subset of the matrix is presented)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	
1	0	7	9	8	7	7	9	9	7	8	5	4	4	4	3	3	4	3	3	4	2	3	5	7	4	4	4	7	3	3	2	2	
2	7	0	7	7	7	7	8	7	9	2	3	4	5	2	4	4	3	3	2	4	3	4	4	4	3	2	3	4	2	2	2	0	
3	9	7	0	8	8	7	7	7	8	6	5	3	4	5	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	3	3	2	3	2	2	2	
4	8	7	8	0	8	7	8	8	8	10	4	4	3	4	4	4	3	4	3	3	4	6	4	3	3	3	4	3	2	1	4		
5	7	7	8	8	0	8	9	7	8	8	3	3	6	5	3	4	4	3	4	4	3	5	4	4	4	2	3	3	2	2	2		
6	7	7	7	7	8	0	6	9	7	7	5	4	4	3	2	4	4	3	4	4	3	4	4	3	3	3	3	3	1	2	1	1	
7	9	8	7	8	9	6	0	8	7	6	4	4	2	3	4	4	4	3	3	3	4	4	4	4	3	4	5	3	3	1	2		
8	9	7	7	8	7	9	8	0	8	8	4	5	4	4	3	3	4	3	5	3	4	5	5	3	3	4	4	4	1	2	2	2	
9	7	9	7	8	8	7	7	8	0	8	2	3	5	4	3	5	4	4	4	4	5	3	5	4	3	2	3	2	2	2	2	2	
10	8	9	8	10	8	7	6	8	8	0	3	4	3	5	4	4	4	4	3	4	4	4	4	4	4	5	2	5	5	1	3	2	2
11	5	2	6	4	3	5	4	4	2	3	0	3	2	2	2	2	2	3	1	2	2	4	2	1	1	2	3	1	1	1	1	1	
12	4	3	5	4	3	4	4	5	3	4	3	0	2	3	3	1	1	1	2	2	2	2	2	2	3	2	2	1	1	1	1	1	
13	4	4	3	3	6	4	2	4	5	3	2	2	0	2	2	2	3	3	1	3	3	2	2	2	2	2	3	2	0	2	1	1	
14	4	5	4	4	5	3	3	4	4	5	2	3	2	0	2	3	1	2	2	3	2	3	1	1	3	2	2	2	1	0	1	1	
15	3	2	5	4	3	2	4	3	3	4	2	3	2	2	0	3	2	4	2	1	2	2	1	2	1	2	2	2	1	0	1	1	
16	3	4	3	4	4	4	4	3	5	4	2	1	2	3	3	0	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	0	1
17	4	4	3	4	4	4	4	4	5	4	2	1	3	1	2	2	0	2	3	2	2	1	1	4	3	1	3	2	1	0	1	0	
18	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	3	1	3	2	4	2	2	0	2	3	1	3	2	2	3	2	3	2	1	1	1	2	2
19	3	3	3	4	4	4	3	5	4	3	1	2	1	2	2	1	3	2	0	1	2	2	2	2	3	2	2	3	1	1	2	1	1
20	4	2	3	3	4	4	3	3	4	4	2	2	3	3	1	1	2	3	1	0	2	3	3	2	2	2	3	3	1	1	2	1	1
21	2	4	4	3	3	3	3	4	4	4	2	2	3	2	2	2	2	1	2	2	0	2	1	1	2	2	3	2	1	1	2	1	1
22	3	3	4	4	5	4	4	5	5	4	4	2	2	3	2	2	1	3	2	3	2	0	1	1	2	2	1	2	1	1	1	1	1
23	5	4	4	6	4	4	4	5	3	4	2	2	2	1	1	2	1	2	2	3	1	1	0	1	1	2	2	2	2	1	0	0	
24	7	4	4	4	4	3	4	3	5	4	1	2	2	1	2	2	4	2	2	2	1	1	1	0	3	2	2	2	2	0	0	1	
25	4	3	4	3	4	3	4	3	4	5	1	3	2	3	1	2	3	3	3	2	2	2	1	3	0	2	2	2	2	1	0	1	1
26	4	2	4	3	2	3	3	4	3	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	3	2	2	2	2	2	0	3	1	1	1	1	1	
27	4	3	3	3	3	3	4	2	5	3	2	3	2	2	2	3	3	2	3	1	1	2	2	2	2	3	0	2	1	2	1	1	
28	7	4	3	4	3	3	5	4	3	5	1	1	2	2	2	1	2	2	3	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	0	1	1	1
29	3	2	2	3	2	1	3	1	2	1	1	1	0	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	0	0	0
30	3	2	3	2	2	2	3	2	2	3	1	2	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	2	1	0	0	1	0	1
31	2	2	2	1	2	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	0	1	1	2	2	2	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1
32	2	0	2	4	2	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	0	2	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0

Important information is that ONA is not limited to rectangular shapes. The only input parameters needed for optimization are the coordinates within the plot.

**Acknowledgments** Support from the National Agency for Agriculture Research (NAZV; grant QJ1320013; M.L.) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Discovery Grant) and the Johnson's Family Forest Biotechnology Endowment to Y.A.E. are highly appreciated.

**Data archiving statement**

In our study, we were developing a mathematical model to optimize spatial allocation of trees in seed orchards. We did not use any real-world data of any species nor any sequencing data.

**Appendix**

The calculation of  $\sigma_{theor.min}^2$  for balanced clonal sizes is based on the assumption that in an ideal clonal deployment, **V** contains only 1 or 2 specific values. Minimum and maximum values of **V** are denoted as  $V_{min}$  and  $V_{max}$ , respectively.  $V_{min}$  and  $V_{max}$  are derived after rounding down and up the expected value  $\frac{N_g}{\binom{N_c}{2}}$ , respectively. The following system of equation is used to derive the number of repetitions of these values in **V**:

$$N_g = R_{min}V_{min} + R_{max}V_{max}, \tag{4}$$

$$\binom{N_c}{2} = R_{min} + R_{max}, \tag{5}$$

where  $R_{max}$  and  $R_{min}$  are the number of repetitions of  $V_{min}$  and  $V_{max}$  in **V**, respectively. The last step is to calculate  $\sigma_{theor.min}^2$  as

$$\sigma_{theor.min}^2 = \frac{\left(\frac{N_g}{\binom{N_c}{2}} - V_{min}\right)^2 R_{min} + \left(\frac{N_g}{\binom{N_c}{2}} - V_{max}\right)^2 R_{max}}{\binom{N_c}{2}}. \tag{6}$$

This reference level does not take into account the fact that in case of unequal clonal sizes the less numerous clones

are placed in positions with a larger number of direct neighborhoods. For this reason, for unbalanced clonal sizes, a second option for calculating the  $\sigma_{theor.min}^2$  was defined as

$$\sigma_{theor.min}^2 = \frac{1}{\binom{N_c}{2}} \sum_{v_{ij} \in C} \left( V_{i,j} - \frac{N_g}{\binom{N_c}{2}} \right)^2, \tag{7}$$

where the theoretical ideal number of close neighborhoods  $V_{ij}$  is calculated for each clonal pair  $ij$  as

$$V_{i,j} = \frac{N_g r_i r_j}{\prod_{i,j} r_i r_j}, \tag{8}$$

where  $r_i$  is the number of ramets of the  $i$ th clone and  $r_j$  is the number of ramets of the  $j$ th clone. This calculated minimum variance is merely theoretical, because its calculation is based on real  $V_{ij}$  values.

**References**

Bell GD, Fletcher AM (1978) Computer organised orchard layouts (COOL) based on the permuted neighbourhood design concept. *Silvae Genet* 27:223–225

Burczyk J, Prat D (1997) Male reproductive success in *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco: the effects of spatial structure and flowering characteristics. *Heredity* 79:638–647

El-Kassaby YA (1995) Evaluation of the tree-improvement delivery system: factors affecting genetic potential. *Tree Physiol* 15:545–550

El-Kassaby YA (2003) Clonal-row vs. random seed orchard designs: mating pattern and seed yield of western hemlock (*Tsuga heterophylla* (Raf.) Sarg.) *For Genet* 10:121–127

El-Kassaby YA, Stoehr MU, Reid D, Walsh CG, Lee TE (2007) Clonal-row versus random seed orchard designs: interior spruce mating system evaluation. *Can J For Res* 37:690–696

El-Kassaby YA, Fayed M, Klápště J, Lstibůrek M (2014) Randomized, replicated, staggered clonal-row (R<sup>2</sup>SCR) seed orchard design. *Tree Genet Genomes* 10:555–563

Giertych M (1975) Seed orchard designs. *For Comm Bull* 54:25–37

Lstibůrek M (2016) R model: implementation of the ONA's algorithm. Available at: <https://katedry.czu.cz/en/kgfld/software> (Sep. 2016)

Lstibůrek M, El-Kassaby YA (2010) Minimum-inbreeding seed orchard design. *For Sci* 56:603–608

Lstibůrek M, Stejskal J, Misevicius A, Korecký J, El-Kassaby YA (2015) Expansion of the minimum-inbreeding seed orchard design to operational scale. *Tree Genet Genomes* 11:12

Nester MR (1994) Modulo tile constructions for systematic seed orchard designs. *Silvae Genet* 43:312–320

O'Connell LM (2003) The evolution of inbreeding in western redcedar (*Thuja plicata*: Cupressaceae). PhD thesis, University of British Columbia

R Development Core Team (2008) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna

White TL, Adams WT, Neale DB (2007) Forest genetics, 1st edn. CABI

## 5.2. Current Advances in Seed Orchard Layouts: Two Case studies in Conifers

Tato publikace ukazuje možnosti využití ONA na dvou případových studiích. Jedná se o možnost využít ONA k doplnění stávajících výsadeb. Fig.1 zobrazuje úspěšně doplněné výsledné schéma semenného sadu jedle bělokoré (*Abies alba*). Klony jsou ve schématu vyznačeny barevně a číselně a dodatečně doplňované klony jsou značeny bílým písmem. Hodnota kritériální funkce ONA pro toto schéma je rovna 0,26. Z pohledu optimalizace panmixie tak dosahuje výsledné schéma vysoké kvality.

Na Fig. 2 je znázorněn výsledek druhé případové studie pro nepravidelný semenný sad douglasky tisolisté (*Pseudotsuga menziesii*). Klonové řady tvořeny příbuznými klony jsou ve schématu vyznačeny bílou barvou. Ostatní klony jsou označeny příslušným číselným identifikátorem a barvou. Hodnota kritériální funkce ONA pro toto schéma je rovna 5,90. Tato relativně vysoká hodnota je způsobena kombinací s klonovými řadami.

Article

# Current Advances in Seed Orchard Layouts: Two Case Studies in Conifers

Kateřina Chaloupková <sup>1,\*</sup>, Jan Stejskal <sup>1</sup>, Yousry A. El-Kassaby <sup>2</sup>, John Frampton <sup>3</sup> and Milan Lstibůřek <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Genetics and Physiology of Forest Trees, Faculty of Forestry and Wood Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýčká 129, 165 21 Prague 6, Czech Republic; stejskalj@fd.czu.cz (J.S.); lstiburek@fd.czu.cz (M.L.)

<sup>2</sup> Department of Forest and Conservation Sciences, Faculty of Forestry, University of British Columbia, 2424 Main Mall, Vancouver, BC V6T 1Z4, Canada; y.el-kassaby@ubc.ca

<sup>3</sup> Department of Forestry and Environmental Resources, College of Natural Resources, North Carolina State University, 3219 Jordan Hall, Raleigh, NC 27695-8002, USA; john\_frampton@ncsu.edu

\* Correspondence: chaloupkovak@fd.czu.cz; Tel.: +420-728-513-742

Received: 19 December 2018; Accepted: 23 January 2019; Published: 24 January 2019



**Abstract:** Currently, there has been an increasing demand on seed orchard designs with respect to mitigating inbreeding in advanced generations or facing severe mortality at sites. Optimum Neighborhood Algorithm design (ONA) excels in solving these issues, as shown in two case studies. The first demonstrates the application of the ONA for populating empty positions in an existing orchard. Following this concept, the ONA can be used for upgrading existing orchards, where only high-value parents are retained and new parents are introduced, thus avoiding the genetic penalty associated with the establishment of new-generation seed orchards. The second illustrates benefits of combining the ONA with the Minimum Inbreeding (MI) seed orchard design. Utilizing the MI, distances among clonal rows of selected clones were maximized on the orchard grid while the remaining single-tree positions were populated by ONA.

**Keywords:** optimum neighborhood algorithm design; minimum inbreeding design; orchard upgrading; spatial arrangements; clonal rows; panmixia

## 1. Introduction

The main task of seed orchards is to ensure the production of abundant and frequently harvested genetic-quality seed for reforestation, without scarifying genetic gain and diversity [1]. Clonal orchards are the most common type, as they secure the transmission of the selected genes to the seed crops [2]. For cost saving and management ease, seed orchards are generally wind-pollinated. Therefore, the location of individual clones' members in the orchard's grid is one of the main factors affecting the mating pattern and the quality of the resulting seed yield [3]. The main requirement for clonal seed orchard design is to maintain adequate distance among relatives and ramets of the same clone to avoid inbreeding and supporting panmixia. In an effort to meet these demands, most seed orchard designs assume that the most frequent genetic exchange occurs among close neighbors [4].

For several decades, computer-based algorithms have been commonly used for developing seed orchard layouts. One of the most frequently employed programs is the Computer Organized Orchard Layout (COOL), as it systematically maintains predetermined separation distance among clonal ramets [5,6]. Separation among clonal ramets becomes more complicated in advanced-generation seed orchards where the inclusion of related parents is often practiced. To overcome this limitation, the Minimum Inbreeding seed orchard design (MI) was developed [7].

A specific group of seed orchard designs was developed implementing clonal rows, mainly to simplify crop management (e.g., supplemental mass pollination, cone harvest, pest control), cost reduction, and maximize genetic efficiency [8–10]. The clonal row concept was adopted as selfing seems to be negligible [8,9], and some studies highlighted its rather low rate in seed orchards [11–13]. In most conifers, the observed low selfing rate is not surprising considering the high genetic load, inbreeding depression, and unique reproductive biology such as polyembryony [14–16]. The main disadvantage of these designs is the neighborhood effect that occurs between rows. This neighboring effect results in increased correlated paternity [8,9], resulting in violating the panmixia requirement in cases of open pollination management. This problem was partly solved by the Randomized, Replicated, Staggered Clonal Row design (R<sup>2</sup>SCR) [10]; however, selective pollination and selective seed harvesting can be mostly conducted only for superior clones, so it is not necessary to allocate all clones as clonal rows. In this specific case, it is more feasible to use an approach combining attributes of the MI [7] and the Optimum Neighborhood Algorithm (ONA) [17] designs, which is presented further in the second case study (establishment of the Douglas fir seed orchard).

Currently, there is no available design that allows the improvement of an existing orchard often affected by mortality (due to the rootstock incompatibility, diseases, and pests), which further affects the orchard production capacity. Moreover, there is no tool for improving existing orchards by adding superior individuals after a genetic thinning. In both cases, it is possible to use the ONA as presented here in the first case study, where it was used for a current European silver fir (*Abies alba* Mill) seed orchard restoration.

In both presented case studies, we capitalize on the advantages of ONA and MI compared to other designs [7,17] from the point of view of minimizing inbreeding and maximizing panmixia. In the second case study, we tested the emerging possibility of combining both algorithms (i.e., ONA and MI). Both designs can be used in situations where an irregular orchard grid of any shape or size and under balanced or unbalanced clonal size exists, which is an important condition as it capitalizes on the possibility of combining both algorithms [17,18].

## 2. Materials and Methods

The MI design is based on the industrial concept of “Quadratic Assignment Problem (QAP)”, with input parameters provided within the C-matrix (intensity of separation between individuals) and the D-matrix (distances among all positions). Therefore, the spatial distribution among individual trees is a function of their genetic relatedness extent. The main advantage of the MI design is maximizing the distance among ramets of related clones, which makes it an optimal tool for establishing advanced-generation seed orchards [18]. Second, the QAP global optimization attributes are unique in comparison to the existing layouts (local search algorithms). The recently introduced ONA design is primarily focused on supporting panmixia by optimizing the number of direct neighborhoods among all present clones (probability of pollination among all clones is more or less the same). A panmictic mating pattern is ensured by minimizing close neighborhoods variation among all present clones. A desired state (i.e., the same number of close neighborhoods among all clones) can be attained within the population of the orchard grid following sequential complex evaluation of every possibility through the iterative form of the algorithm. Moreover, ONA can be further combined with other designs because it can easily populate predefined schemes. In these cases, all neighborhoods with occupied positions are considered in the input scheme and are included in the optimization. This became possible through the direct implementation within the algorithm, and thus it became feasible to use the ONA for the improvement of existing orchards [17].

The functionality of the ONA is based on maximizing panmixia by optimizing the size of the neighborhood using the parameter  $\sigma_{min}^2$  (variance in the number of direct neighbors among all clones) [17]. Contrastingly, the functionality of the MI design is based on maximizing the distance between the selected clones using the parameter  $d_{min}$  (represents the inverse sum of squares of all



possible distances between any two ramets of the same clone and across all clones) [18]. The parameter  $\sigma_{min}^2$  is used for the resulting evaluation of the respective layouts.

The first case study involved populating empty positions (resulting from mortality of some ramets) in an existing European silver fir seed orchard. The original (remaining) clones were surrounded by ramets available from stock using 600 iterations of the ONA design. In the upgrading process, 46 empty positions were populated by 11 different clones. There were 39 clones of different representations (range: 3 to 9 ramets per clone) in the final scheme. This seed orchard was square-shaped, with spacing of 1:1, and it had 225 positions. The resulting scheme is depicted in Figure 1.

The second case study involved the establishment of a Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) seed orchard with 666 positions with an asymmetrical layout. The orchard's parental population consisted of 23 clones, with two (#21 and #22) having a common single ancestor (parent). In the resulting scheme, these two related clones represented the main limiting factor (i.e., common ancestry), thus they were first deployed by the MI design in the form of five-tree clonal rows, with clones #21 and #22 represented by 7 and 6 rows respectively (arbitrarily selected). Subsequently, the other clones (#1 to #20) populated the remaining grid positions following the ONA design. Spatial optimization, assuming clonal rows, was performed based on the central position of each row, utilizing the original MI protocol [18]. Square layout was considered with 20 independent iterations of the MI scheme. This setting followed the methodology presented in [7]. In the resulting MI scheme, only clonal rows of related clones were initially placed, and other positions (601 positions) were populated by unrelated clones using the ONA (100 independent iterations), as shown in Figure 2.

The original ONA R code, which can be used for creating basic layouts, is available at <https://katedry.czu.cz/en/kgfld/software>.

### 3. Results and Discussion

The layout depicted in Figure 1 displays the populating of empty positions in the existing European silver fir orchard (with added clones highlighted by white font). The Douglas fir resulting layout, shown in Figure 2, shows successful separation of the related clones (number 22 and 23) in clonal rows.

The qualities of the resulting schemes were assessed from the perspective of maximum panmixia using the parameter  $\sigma_{min}^2$ , with values of 0.26 and 5.90 for the European Silver fir and Douglas fir, respectively. In the second case, the higher value of  $\sigma_{min}^2$  was caused by the presence of clonal rows.

In comparison, Chaloupková et al. [17] reported  $\sigma_{min}^2$  values equal to 0.24 and 3.85 for balanced and unbalanced clonal sizes, respectively. The parameter values are similar to the presented case studies, so this comparison shows the functionality of the ONA in these cases (upgrading existing orchards and ONA and MI merging), which are displayed here.

It is worth mentioning that ONA and MI designs have already been compared using the abovementioned parameters with random schemes and the COOL [7], as well as with the R<sup>2</sup>SCR design [17].

According to theoretical studies on clonally propagated reproductive material, the population size of 18 individuals should be reasonable and close to "optimal" to safeguard against potential unforeseen contingencies [19]. In an extensive review on the risks connected to clonal forestry, Wu (2018) [20] reports five to 30 clones as a reasonable number, depending on the species. Such population sizes are common for second-generation seed orchards. Therefore, advanced-generation seed orchards can also serve as both gene conservation and seed production units in some cases [21,22]. Several functional examples can be found for such instances in Swedish forestry [20]. However, these studies generally encompassed the random mating and other Hardy–Weinberg assumptions to achieve high genetic variation in forestry. One of the factors influencing the mating pattern in open pollination seed orchards (in addition to seed and pollen production, and reproduction phenology) is the orchard layout [3]. Therefore, the ONA is deemed as a suitable tool for promoting panmixia.

There are additional factors which are detrimental to the genetic quality of seed orchard crop. These include, differences in clonal flowering phenology and fertility influencing the mating patterns and contributions of clones. Both of these factors were investigated in many field studies and are considered to be highly significant [23–25], and even software analyzing floral phenological synchronization in seed orchards was recently developed [26]. However, if the floral phenology is known, then it is possible to include the presumed flowering pattern as the input parameter in the MI design so that panmixia can be promoted during orchard design [7]. Another key factor is the pollen contamination occurrence, which increases the genetic diversity but also decreases the improvement effort efficiency. Molecular tools have been used to quantify the pollen contamination in many studies, and its value ranges from 30% to 40% [27] or it is even higher [28,29]. Unfortunately, the orchard design cannot be used for pollen contamination minimizing. It is known that the most effective method for its elimination/reduction is using greenhouses for maximum isolation, but another, less expensive method is the implementation of specific approaches directly to the breeding program. For example, the “Breeding without breeding” method can be used. In such a case, phenotypic preselection in progeny trials could lead to reduced contamination rates [30–33].

Figures, Tables, and Schemes

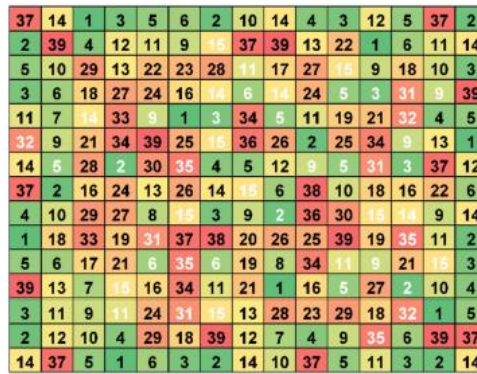


Figure 1. Example of the Optimum Neighborhood Algorithm design for refilling empty positions in an existing orchard. Numbers designate individual clones’ IDs. Numbers in white color represent refilled positions utilizing the ONA algorithm.

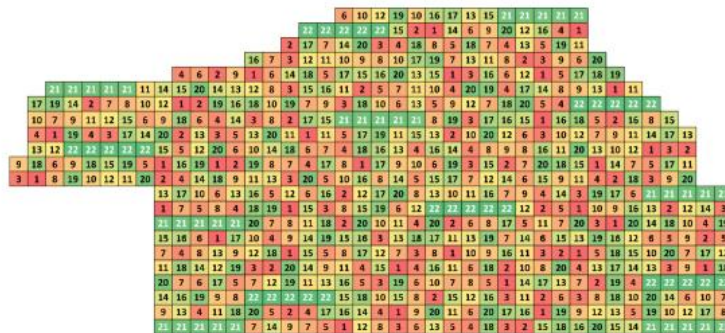


Figure 2. Design combining both Minimum Inbreeding and Optimum Neighborhood Algorithm designs. Numbers designate individual clones’ IDs. Numbers in white color represent clonal rows utilizing MI algorithm. Remaining entries were optimized by ONA algorithm.

#### 4. Conclusions

The results show that the presented approach maintains all the advantages of both ONA and MI designs, and thus it is particularly suitable for establishing advanced-generations seed orchards. In addition to combining the advantages of the two designs, this new approach also eliminates the occurrence of the neighborhood effect. The influence of the neighborhood effect decreases when only the clones of the highest genetic gain are placed in clonal rows. These clones can be effectively managed for controlled pollination, which is also more easily applied within clonal rows as compared to orchards of regular layouts.

Equally interesting is the possibility of improving existing orchards by ONA, as demonstrated in the European Silver fir orchard, where ONA was effectively used for dealing with mortality of certain grafts. In a similar fashion, the same concept can be utilized for upgrading orchards after genetic thinning, where only high-value parents are retained and some positions may need to be populated.

**Author Contributions:** Conceptualization, K.C., M.L., and Y.A.E.-K.; methodology, K.C. and J.S.; software, K.C., M.L. and J.S.; validation, K.C. and J.S.; formal analysis, K.C.; investigation, K.C.; resources, K.C. and J.E.; data curation, K.C.; writing—original draft preparation, K.C. and J.S.; writing—review and editing, Y.A.E.-K., J.E.; visualization, K.C.; supervision, M.L.; project administration, K.C.; funding acquisition, K.C., J.S., and M.L.

**Funding:** Authors appreciate support from the Internal Grant Agency of Faculty of Forestry and Wood Sciences, Czech University of Life Sciences (IGA; grant A05/17), National Agency for Agriculture Research (NAZV; grant QJ1320013, QJ1620110), and “EXTEMIT-K”, No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15\_003/0000433 financed by OP RDE.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

#### References

- Zobel, B.J.; Barber, J.; Brown, C.L.; Perry, T.O. Seed orchards—Their concept and management. *J. Forest.* **1958**, *56*, 815–825.
- Giertych, M. Seed orchard designs. *For. Comm. Bull.* **1975**, *54*, 25–37.
- White, T.L.; Adams, W.T.; Neale, D.B. Deployment—Open pollinated varieties full-sib families and clones. In *Forest Genetics*; CABI publishing: Wallingford Oxfordshire, UK, 2007; pp. 439–478.
- Funda, T.; El-Kassaby, Y.A. Review: Seed orchards genetics. *CAB Rev.* **2012**, *7*, 13. [[CrossRef](#)]
- Bell, G.D.; Fletcher, A.M. Computer organised orchard layouts (COOL) based on the permuted neighbourhood design concept. *Silvae Genet.* **1978**, *27*, 223–225.
- Charkravarty, G.N.; Bagchi, S.K. Enhancement of the computer program of the permuted neighborhood seed orchard design. *Silvae Genet.* **1994**, *43*, 177–179.
- Lstibůrek, M.; Stejskal, J.; Misevicius, A.; Korecký, J.; El-Kassaby, Y.A. Expansion of the minimum-inbreeding seed orchard design to operational scale. *Tree Genet. Genomes* **2015**, *11*, 12. [[CrossRef](#)]
- El-Kassaby, Y.A. Clonal-row vs. random seed orchard designs: Mating pattern and seed yield of western hemlock (*Tsuga heterophylla* (Raf.) Sarg.). *For. Genet.* **2003**, *10*, 121–127.
- El-Kassaby, Y.A.; Stoehr, M.U.; Reid, D.; Walsh, C.G.; Lee, T.E. Clonal-row vs. random seed orchard designs: Interior spruce mating system evaluation. *Can. J. For. Res.* **2007**, *37*, 690–696. [[CrossRef](#)]
- El-Kassaby, Y.A.; Fayed, M.; Klápště, J.; Lstibůrek, M. Randomized, replicated, staggered clonal-row (R2SCR) seed orchard design. *Tree Genet. Genomes* **2014**, *10*, 555–563. [[CrossRef](#)]
- Mitton, J.B. The dynamic mating systems of conifers. *New Forest.* **1992**, *6*, 197–216. [[CrossRef](#)]
- El-Kassaby, Y.A. Evaluation of the tree improvement delivery system: Factors affecting the genetic potential. *Tree Physiol.* **1995**, *15*, 545–550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- O’Connell, L.M. The Evolution of Inbreeding in Western Redcedar (*Thuja plicata*: Cupressaceae). Ph.D. Thesis, The University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada, 2003.
- Griffin, A.R.; Lindgren, D. Effect of inbreeding on production of filled seed in *Pinus radiata* experimental results and a model of gene action. *Theor. Appl. Genet.* **1985**, *71*, 334–343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Woods, J.H.; Heaman, J.C. Effect of different inbreeding levels on filled seed production in Douglas-fir. *Can. J. For. Res.* **1989**, *19*, 54–59. [[CrossRef](#)]

16. Williams, C.G.; Savolainen, O. Inbreeding depression in conifers: Implications for breeding strategy. *For. Sci.* **1996**, *42*, 102–117.
17. Chaloupková, K.; Stejskal, J.; El-Kassaby, Y.A.; Lstibířek, M. Optimum neighborhood seed orchard design. *Tree Genet. Genomes* **2016**, *12*, 105. [[CrossRef](#)]
18. Lstibířek, M.; El-Kassaby, Y.A. Minimum-inbreeding seed orchard design. *For. Sci.* **2010**, *56*, 603–608.
19. Yanchuk, A.D.; Bishir, J.W.; Russel, J.H.; Polsson, K.R. Variation in volume production through clonal deployment: Results from a simulation model to minimize risk for both a currently known and unknown future pest. *Silvae Genet.* **2006**, *55*, 25–37. [[CrossRef](#)]
20. Wu, H.X. Benefits and risk of using clones in forestry—A review. *Scan. J. For. Res.* **2018**, *33*. [[CrossRef](#)]
21. Namkoong, G.; Kang, H.C.; Brouard, J.S. Provenance testing, ecogeographic surveys, and conservation. In *Tree Breeding: Principles and Strategies*; Springer: New York, NY, USA, 1988; pp. 132–159.
22. Frankel, O.H.; Brown, A.H.D.; Burdon, J.J. *The Conservation of Plant Biodiversity*; Cambridge University: Cambridge, UK, 1995.
23. Erickson, V.J.; Adams, W.T. Mating success in a coastal Douglas-fir seed orchard as affected by distance and floral phenology. *Can. J. For. Res.* **1989**, *19*, 1248–1255. [[CrossRef](#)]
24. El-Kassaby, Y.A.; Reynolds, S. Reproductive phenology, parental balance, and supplemental mass pollination in a sitka-spruce seed-orchard. *Forest Ecol. Manag.* **1990**, *31*, 1–2. [[CrossRef](#)]
25. Nikkanen, T. Reproductive phenology in a Norway spruce seed orchard. *Silva Fenn.* **2001**, *35*, 39–53. [[CrossRef](#)]
26. Zas, A.R.; Merlo, E.; Fernández, L.J. SYNCHRO: A SAS program for analysing the floral phenological synchronisation in seed orchards. *Silvae Genet.* **2003**, *52*, 212–215.
27. Slavov, G.T.; Howe, G.T.; Adams, W.T. Pollen contamination and mating patterns in a Douglas-fir seed orchard as measured by simple sequence repeat markers. *Can. J. For. Res.* **2005**, *35*, 1592–1603. [[CrossRef](#)]
28. Torimaru, T.; Wang, X.R.; Fries, A.; Anderson, B.; Lindgren, D. Evaluation of pollen contamination in an advanced Scots pine seed orchard. *Silvae Genet.* **2009**, *58*, 262–269. [[CrossRef](#)]
29. Pakkanen, A.; Nikkanen, T.; Pulkkinen, P. Annual variation in pollen contamination and outcrossing in a *Picea abies* seed orchard. *Scan. J. For. Res.* **2000**, *15*, 399–404. [[CrossRef](#)]
30. El-Kassaby, Y.A.; Lstibířek, M. Breeding without breeding. *Genet. Res.* **2009**, *91*, 111–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Lstibířek, M.; Klápště, J.; Koblíha, J.; El-Kassaby, Y.A. Breeding without breeding: Effect of gene flow on fingerprinting effort. *Tree Genet. Genomes* **2012**, *8*, 873–877. [[CrossRef](#)]
32. Lstibířek, M.; Ivanková, K.; Kadlec, J.; Koblíha, J.; Klápště, J.; El-Kassaby, Y.A. Breeding without breeding: Minimum fingerprinting effort with respect to the effective population size. *Tree Genet. Genomes* **2011**, *7*, 1069–1078. [[CrossRef](#)]
33. Lstibířek, M.; Hodge, G.R.; Lachout, P. Uncovering genetic information from commercial forest plantations—Making up for lost time using “breeding without breeding”. *Tree Genet. Genomes* **2015**, *11*, 55. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### 5.3. Spatial Allocation of Genetic Thinning in Seed Orchards

Třetí publikace popisuje použití ONA metodiky v případě genetické probírky semenného sadu. Zásadní část výsledků je v publikaci zobrazena na Fig.1. Na ose y je parametr  $var_{min}$ , na ose x pak intenzita probírky. Je rozlišeno, zda byla selekce aplikována na randomizované schéma (RRL) nebo na simulované ONA schéma pomocí ONA genetické probírky (ONA). GTL zde značí genetickou probírku provedenou podle Linear Deployment přístupu a GTS systematickou vyrovnanou genetickou probírku.

Pro ONA schéma s aplikováním systematické probírky i Linear Deployment (ONA:GTS a ONA:GTS) je patrný trend zvyšující se hodnoty parametru  $var_{min}$ . Tento výsledek není překvapivý, jelikož vstupním schématem pro provedení probírky byl sad vytvoření pomocí základního ONA algoritmu. Se zvyšující se intenzitou probírky docházelo také ke zvyšující se nevyrovnanosti velikostí klonů, především pro ONA schéma s aplikováním Linear Deployment probírky (ONA:GTL). Vyšší intenzita probírky v tomto případě tedy vede ke snižující se náhodnosti křížení mezi klony. Pro ONA:GTL je nárůst parametru významnější pro nízké probírkové intenzity. Pro střední intenzity probírky jsou výsledky s využitím Linear Deployment a systematické probírky srovnatelné. Při vyšších intenzitách probírky jsou hodnoty parametru  $var_{min}$  pro Linear Deployment metodu nižší než pro systematickou metodu. To je způsobeno faktem, že Linear Deployment metoda nezpůsobuje větší nevyrovnanosti ve velikostech klonů. Hodnota  $var_{min}$  vychází obecně nižší pro optimalizovaná zadání (ONA:GTS a ONA:GTL) než pro znáhodněná zadání (RRL:GTS a RRL:GTL). To je opět způsobeno tím, že vstupním schématem pro provedení probírky bylo schéma ONA. Pro znáhodněná zadání (RRL) se při nižších intenzitách genetické probírky jeví vhodnější použít systematický přístup.

Je zřejmé, že výsledky jsou značně ovlivněny nejen prostorovým rozvržením genetické probírky, ale také způsobeny rozdílnou distribucí velikostí klonů určených k odstranění. Při středních intenzitách probírky však oba přístupy (GTS a GTL) fungují obdobně. Při velmi vysoké intenzitě probírky je z pohledu panmixie jednoznačně vhodnější použít LD přístup.

Fig.2. blíže porovnává vliv vybraného typu genetické probírky (systematická a Linear Deployment) na výskyt sousedství ramet jednoho klonu pro znáhodněná schémata (RRL) a možnosti optimalizace těchto sousedství pomocí ONA genetické probírky. Zdá se, že pro znáhodněné vstupní schéma jsou oba přístupy k definování klonů určených k probírce stejně vhodné. Z grafu vyplývá, že použití ONA genetické probírky snižuje počet přímých sousedství v rámci klonů, jak pro systematickou, tak pro LD probírku. Tento parametr nebyl pro optimalizované ONA schéma uveden, protože je ve všech případech roven 0.

Výsledná schémata pro optimalizované ONA zadání s použitím Linear Deployment nástroje pro výběr indiferentních klonů a ONA nástroje pro genetickou probírku jsou zobrazena na Fig.3., 4 a 5. V případě Fig.3. se jedná o 10% intenzitu, pro Fig.4. o 20% intenzitu a pro Fig.5. o 30% intenzitu. Klony určené k odstranění jsou značeny černě.

Fig.6. zobrazuje, jak ONA genetická probírka efektivně snižuje parametr  $var_{min}$  při aplikaci na existující sad Doubrava. Je patrné, že s rostoucí intenzitou genetické probírky ( $p$ ) a současně klesajícími rozdíly ve velikostech klonů, klesá hodnota výsledného rozptylu exponenciálně.

# Spatial optimization of genetic thinning in seed orchards



Kateřina Chaloupková<sup>1</sup> and Milan Lstibůrek<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Key message:** We provide a mathematical model to determine which trees should be ruled out from the grid to promote random mating in seed orchards under genetic thinning.

**Context:** Genetic thinning (roguing) is a common practice in forest tree breeding to remove inferior genotypes in seed orchards, thus boosting the genetic worth of the seed crop.

**Aims:** To develop a general methodology for spatial optimization of genetic thinning. It should promote random mating and consider any existing seed orchard layout.

**Methods:** The model is based on the Optimum-Neighborhood Allocation algorithm (Chaloupková et al., Forests 10:1-6, 2019). The algorithm's efficiency was evaluated using computer simulation. A fully randomized scheme was used as a reference. In addition, the study provides a demonstration on an actual seed orchard.

**Results:** Simulations confirm the method's efficiency in promoting random mating compared to the fully randomized allocation across a wide range of selection intensities. We suggest Linear Deployment as a preferred method for calculating optimum deployment contributions at higher thinning intensities. The algorithm was programmed in R and is publicly available.

**Conclusion:** Breeders can use the software and follow the example to implement genetic thinning in different practical scenarios assuming any seed orchard layout. The approach enhances random mating while maximizing genetic response to selection.

**Keywords:** Seed orchards, Spatial layouts, Panmixis, Optimum-Neighborhood Algorithm, Linear deployment

## 1 Introduction

Seed orchards connect tree breeding programs and operational forestry. They are the source of genetically improved seed for afforestation. In the initial breeding cycle, phenotypically superior individuals (designated as plus trees) are identified in forest stands. They are typically grafted to establish the first-generation (clonal) seed orchards. As breeding progresses through a typical sequence of breeding activities (mating, testing, and

selection), new seed orchards are planted with grafted top-ranking genetically improved individuals (clones). Due to repeated cycles of selection, advanced-generation seed orchards are associated with higher genetic gains in important quantitative and qualitative traits (White et al. 2007; Funda and El-Kassaby 2013).

Seed orchard management is complex, including the establishment, long-term maintenance, and periodic harvest of the seed crop. During the planning period, a decision is made on the appropriate spatial distribution of vegetative propagules (ramets) of the respective clones on the orchard's grid (spatial design). During the 1950s to early 1970s, numerous spatial configurations were developed primarily under the assumption of crossbreeding

Handling editor: Véronique Jorge

\*Correspondence: lstiburek@fd.czu.cz

Faculty of Forestry and Wood Sciences, Czech University of Life Sciences, Kamýcká 129, 16000 Praha 6, Czech Republic



© The Author(s) 2022. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

occurring among neighboring individuals; see Giertych (1975) for a comprehensive review. While this assumption was confirmed by case studies (Burczyk and Prat 1997; Chen et al. 2018), additional factors should be considered while choosing the appropriate orchard design, primarily in advanced breeding cycles. Hodge and White (1993) list four such criteria: (1) to maximize genetic gain while maintaining acceptable genetic diversity, (2) to provide for random mating, (3) to minimize inbreeding, and (4) to minimize the impact of selection errors (maintaining flexibility for roguing, denoted as the genetic thinning). Contemporary designs address most of these concerns (Lstibůrek and El-Kassaby 2010; El-Kassaby et al. 2014; Liesebach et al. 2021). In the current study, we utilize the Optimum Neighbourhood Allocation (ONA) scheme (Chaloupková et al. 2019), which promotes panmixia by minimizing the variance of the counts of adjacencies among all clones across the orchard's grid.

In the initial breeding cycle, the genetic worth of clones is unknown prior to progeny testing. Once the parental genetic values become available from progeny trials, one can rank and remove inferior parents from the orchard. This operation is called "genetic thinning" or "roguing." These genetically improved seed orchards are regarded as the 1.5 generation. They are genetically superior to the initial first-generation orchards due to the effect of selection. They serve their purpose before the 2<sup>nd</sup> generation orchards provide a sufficient quantity of seed (White et al. 2007).

To keep things simple, breeders would often opt for roguing a specific number of clones systematically from the orchard, e.g., every other tree in a row. There is a more efficient approach considering genetic gain and diversity in the seed orchard crop. Optimum clonal proportions (expected gametic contributions following the thinning) can be calculated from predicted additive genetic (breeding) values (Prescher et al. 2008; Bondesson and Lindgren 1993). The approach is based on the Linear Deployment concept by Lindgren and Matheson (1986). Theoretically, a more general selection optimization protocol (e.g., Funda et al. 2009) could also be extended for genetic thinning. However, Linear Deployment is the method of choice during initial breeding cycles (assumption of unrelated and non-inbred clones), when genetic thinning is typically considered.

In most cases, genetic thinning alters the original objective of the seed orchard layout. Breeders are faced with the problem of identifying the exact ramets that should be removed from the grid, keeping in mind the main criteria of seed orchard designs. Currently, there is no methodology to optimize the spatial distribution of genetic thinning across the orchard's grid. For this purpose, we provide a new method based on the ONA

scheme. The optimum allocation is acquired from the assessment of removing a given candidate ramet from every position across the grid and all candidate clones, minimizing the ONA's criterion function. Following the genetic thinning, the resulting scheme is thus optimized to promote random mating and reduce the level of inbreeding. We demonstrate the approach using computer simulation and the actual seed orchard layout.

## 2 Methods

### 2.1 Conceptual plan

We start with any seed orchard spatial configuration, i.e., the spatial distribution of  $N_C$  clones on a grid. It is assumed that breeders determine the intensity of genetic thinning using one of the approaches introduced earlier (e.g., Linear Deployment).

Next, we optimize the spatial distribution of genetic thinning, pointing at particular trees on the grid that should be removed. After conducting the thinning, the idea is to promote panmixia among all remaining entries. Therefore, we adopted (with some modifications) the Optimum-Neighborhood Allocation scheme by Chaloupková et al. (2016).

### 2.2 Mathematical algorithm

To assist tree breeders with implementing the algorithm using their unique input parameters, we provide R-package "thinONA" (see "Code availability" section, R Core Team 2022).

The existing seed orchard layout (subjected to genetic thinning) is provided in matrix ORCHARD ( $m$  rows and  $n$  columns). Elements of the matrix are labeled using an integer sequence from the first clone, denoted 1, to the last clone, denoted  $N_C$ . The goal is to remove a given subset REMOVE of genetic entries from the existing grid. There are no distributional assumptions on REMOVE. Note that clonal identification numbers in REMOVE must correspond to those in ORCHARD. For example, REMOVE = {1, 1, 3, 4} designates that two ramets of the clone one and one ramet of clones 3 and 4 should be removed from the grid.

In the first step, a matrix PAIRS is formed. It consists of the sums of direct neighborhood positions across all possible clonal pairs across ORCHARD. (For example, assuming clones A and B, the corresponding value in PAIRS has a value of two if their respective ramets are present as direct neighbors two times across the entire grid). A single candidate is then selected from REMOVE (based on the clonal size; clones with a higher number of ramets are selected first; if there are more candidate clones of the same size, the choice is



random). The candidate is then located in PAIRS to identify its most frequent direct neighbor. All such positions in ORCHARD are evaluated to determine which elimination minimizes the criterion function (introduced in the next paragraph). The candidate is then removed from the matrix ORCHARD position and the candidate list in the vector REMOVE.

Candidate positions on the grid are individually evaluated from the top-left to the bottom-right corner assuming eight closest neighboring positions (two horizontal, two vertical, and four diagonal). The algorithm is flexible to evaluate more distant positions on the grid if requested by the breeder. We developed a criterion function to quantify the impact of removing entries in REMOVE in each location across the grid for the  $Var_{\min}$  criterion (see Chaloupková et al. 2016 for details). The algorithm is based on the minimization of the criterion function:

$$\min \rightarrow \frac{2}{N_G} \sum_{i=1}^{N_G} \sum_{j=1, j \neq i}^{N_G} \left[ \frac{n_{ij} - 1}{n_{ij}} \left( n_{ij} - \frac{2N_G}{N_G} \right)^2 \right] + pw \quad (1)$$

where  $n_{ii}$  and  $n_{ij}$  depict the number of single and different clones' adjacencies, respectively;  $N_G$  is the total number of adjacencies existing within the rectangular orchard grid,  $w$  is a weight parameter to penalize the placement of identical clone's ramets as direct neighbors, and  $p$  is the sum of all  $n_{ii}$  elements. The component  $w$  is a higher-order value than the first addend (ex. 99999), leading to the effective elimination of direct neighborhoods of identical genetic entries.

The optimization goal is to minimize the variance of matrix PAIRS while constraining the placement of identical clones' ramets as direct neighbors.

### 2.3 Computer simulation

We adopted the ONA scheme and optimized the spatial distribution of 40 clones with equal sizes (number of ramets) on a square grid of 20 rows and 20 columns (Chaloupková et al. 2016). Respective breeding values were sampled from a standardized normal distribution. Two scenarios of genetic thinning were assumed. First, the inferior one-half of clones were subjected to simple thinning of equal intensity (scenario Genetic Thinning Simple, GTS). Second, we followed the Linear Deployment algorithm (Lindgren and Matheson 1986) to optimize selection intensity across the assumed 40 clones (scenario Genetic Thinning Linear Deployment, GTL). The selected proportion during genetic thinning ranged from 5% to 40%. In each scenario, vector REMOVE was

created, consisting of clonal identification numbers subjected to removal on the grid.

### 2.4 Scots pine seed orchard

The Scots pine (*Pinus sylvestris*, L.) seed orchard "Doubrava" is managed by the Forest of the Czech Republic (state enterprise), district Plasy. It was established in 1980 using a simplistic randomization protocol with a spacing of  $6 \times 6$  m across 6.5 ha. The orchard consists of 1165 ramets of 87 clones with highly variable sizes (ranging from 1 to 28 ramets per clone). Geographic coordinates are  $49^{\circ}54'31''N$ ,  $13^{\circ}26'34''E$ ; altitude 380 m.

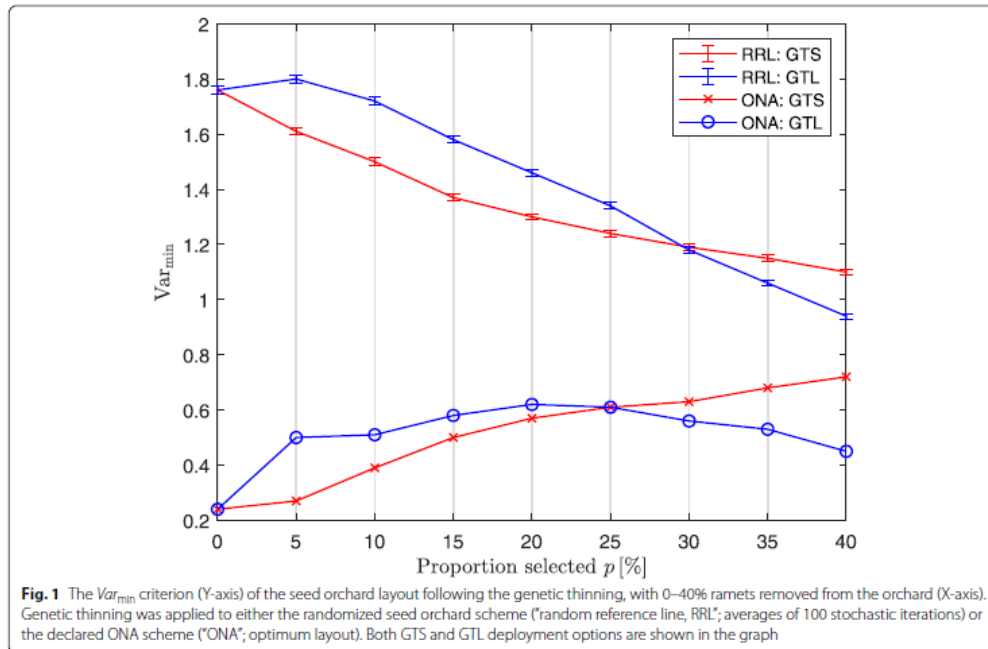
We utilized breeding values from half-sib progeny trials (Kaňák 2011). We followed the Linear Deployment algorithm (Lindgren and Matheson 1986) to derive optimum clonal sizes. The selection intensity of genetic thinning (expressed as a proportion) ranged from 5 to 40%. In each scenario, assuming the optimum clonal sizes, vector REMOVE was created, consisting of specific ramets subjected to removal on the grid. The spatial distribution of genetic thinning was then optimized using the mathematical algorithm (Section 2.2).

All schemes mentioned above were evaluated using the R package OrchSTAT (Lstibůrek 2022). As a reference line (Section 2.3), averages of the above statistics were calculated for a fully randomized seed orchard layout, assuming 100 stochastic iterations (designated as the "random reference line").

## 3 Results

Assuming efficient baseline seed orchard layout (ONA) with equal clonal sizes, genetic thinning (ONA algorithm) promotes  $Var_{\min}$ , diversifying gametic contributions among the parental genotypes to the seed orchard's crop (departure from panmixia). Interestingly, this increment in  $Var_{\min}$  is more significant under Linear Deployment (GTL scenario) at lower selection intensity than in the simplistic GTS scenario ( $p$  up to 20%). Both approaches perform similarly regarding  $Var_{\min}$  at intermediate thinning intensities. GTL results in lower  $Var_{\min}$  at higher thinning intensities (over 20%), which is undoubtedly beneficial. This is likely due to more open spaces on the grid combined with a more gradual change of clonal proportions under the GTL (see ONA lines in Fig. 1).

On the contrary, a reduction in  $Var_{\min}$  is associated with the initial fully randomized scheme (see RRL lines in Fig. 1). GTS seems to be more efficient in reducing  $Var_{\min}$  at  $p$  up to 30%, yet it is inferior to GTL at  $p > 30\%$ . In line with the reduction of  $Var_{\min}$ , i.e., the minimization of the PAIRS matrix, the optimization is constrained by the initial spatial distribution with multiple neighborhoods among the ramets of the same clone.



The algorithm efficiently reduces these identical clones' adjacencies (Fig. 2). It seems that both GTS and GTL are similarly efficient in this regard. On the contrary, the sum of diagonal elements of PAIRS was always zero under the ONA schemes (not shown in Fig. 2), which is attributable to the second addend in Eq. 1. The actual spatial distribution of genetic thinning, considering the GTL option, is provided in Figs. 3, 4, and 5 for three thinning intensities (proportions 10, 20, and 30%).

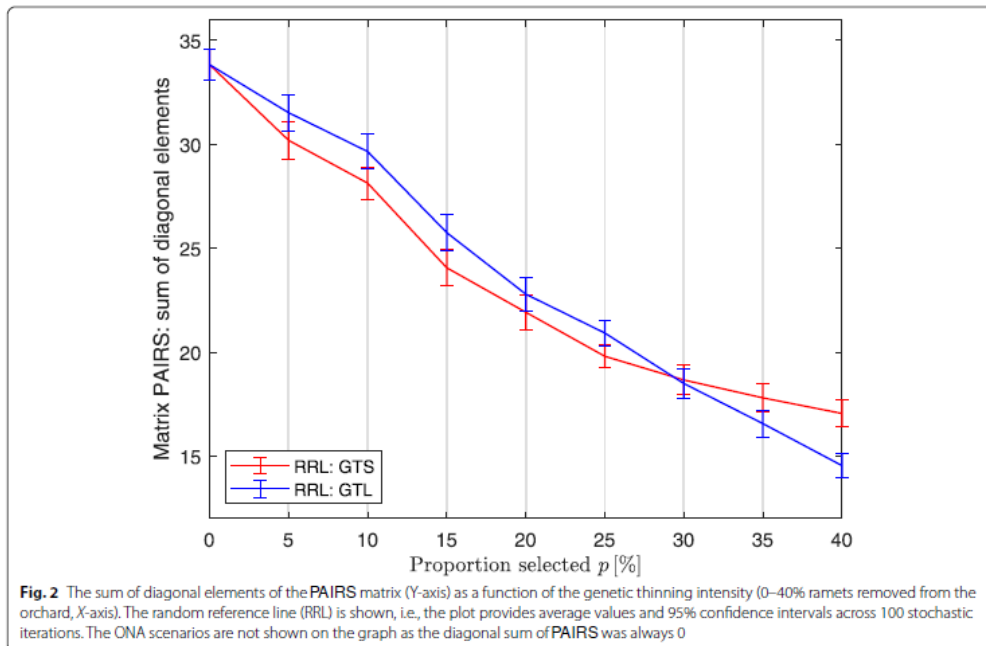
The efficiency of  $Var_{min}$  minimization is very apparent in the seed orchard Doubrava (primary Y-axis, blue line, Fig. 6).  $Var_{min}$  drops exponentially with  $p$  across the whole studied interval. Variation in clonal sizes is reduced with  $p$  (secondary Y-axis, box plots).

#### 4 Discussion

This study demonstrates that genetic thinning could be spatially optimized across the orchard's grid. Breeders should evaluate the impact of genetic thinning under specific circumstances in line with the main criteria of seed orchard designs (Hodge and White 1993). As presented in our study, interactions among the main variables are not trivial. The effect of genetic thinning on expected panmixia ( $Var_{min}$ ) is proportional to the

selection intensity, the original seed orchard layout, and the distribution of clonal sizes. Thorough roguing is typically advocated in seed orchards since the genetic response to selection depends on high selection intensity (Falconer and Mackay 1996). Seed orchards that have been established with an excessive number of plus trees highly benefit from intensive roguing (a prerequisite to capturing meaningful genetic response). High genetic gain (selection intensity) is, however, associated with unavoidable loss of seed production.

While the build-up of  $Var_{min}$  is minimized using the modified ONA algorithm, its relative magnitude is still substantial, provided the original design was efficient (ONA lines in Fig. 1). In numerous practical scenarios (less efficient spatial designs, highly variable clonal sizes), the ONA-based genetic thinning preserves or even reduces the  $Var_{min}$  of the original scheme, as seen in the Doubrava orchard (Fig. 6). Thus, genetic thinning could be used to "improve" original less efficient seed orchard layouts. Breeders can evaluate this effect by comparing the  $Var_{min}$  before and after the thinning using the R package OrchSTAT ("Code availability" section). Our method also reduces the same clone's adjacency (if present in the initial orchard), limiting the selfing rate (Fig. 2).



16	23	17	1	4	39	37	4	31	7	25	40	15	31	6	28	27	24	11	12
2	20	9	33	32	13	12	26	17	24	39	26	13	29	33	22	14	37	29	25
30	11	8	37	34	22	8	36	34	21	9	16	38	20	21	26	5	36	1	10
15	19	6	18	38	15	7	30	4	27	32	3	24	19	28	2	18	27	40	3
32	14	7	10	17	5	12	28	29	23	31	18	13	23	34	35	15	16	6	12
8	38	2	32	30	16	1	18	39	5	11	21	30	1	14	10	21	25	35	38
23	25	36	6	26	11	22	20	6	34	40	38	39	31	12	20	37	3	33	27
22	35	9	19	10	24	36	31	25	4	9	28	8	2	19	17	22	19	39	10
4	5	29	22	40	28	16	10	38	18	14	13	17	27	3	35	39	11	4	8
24	32	28	2	37	7	33	13	23	33	40	25	11	14	30	20	32	3	7	35
12	15	9	31	1	15	36	3	5	30	24	32	29	16	34	7	26	23	37	13
23	21	36	35	26	6	34	8	21	6	17	8	40	31	12	29	27	12	6	27
1	40	11	28	24	1	16	37	14	29	3	15	20	4	9	33	2	20	25	28
38	35	17	37	19	8	4	15	39	36	22	10	5	7	2	24	13	5	3	30
19	16	2	18	25	27	30	38	24	23	21	19	9	26	21	4	18	27	40	9
5	25	14	1	7	22	26	14	31	34	17	1	13	25	33	11	10	34	20	23
17	39	32	10	39	34	17	40	33	8	29	36	30	22	12	5	28	13	35	15
13	6	2	36	12	9	38	7	6	23	18	19	32	18	38	32	31	21	7	29
11	15	4	3	14	21	27	11	14	35	26	33	16	20	37	30	35	19	16	3
33	20	28	26	18	39	31	1	5	37	36	10	9	22	29	40	2	8	34	24

**Fig. 3** The ONA seed orchard layout with 10% genetic thinning (black cells) following the Linear Deployment (declared ONA, GTL deployment)

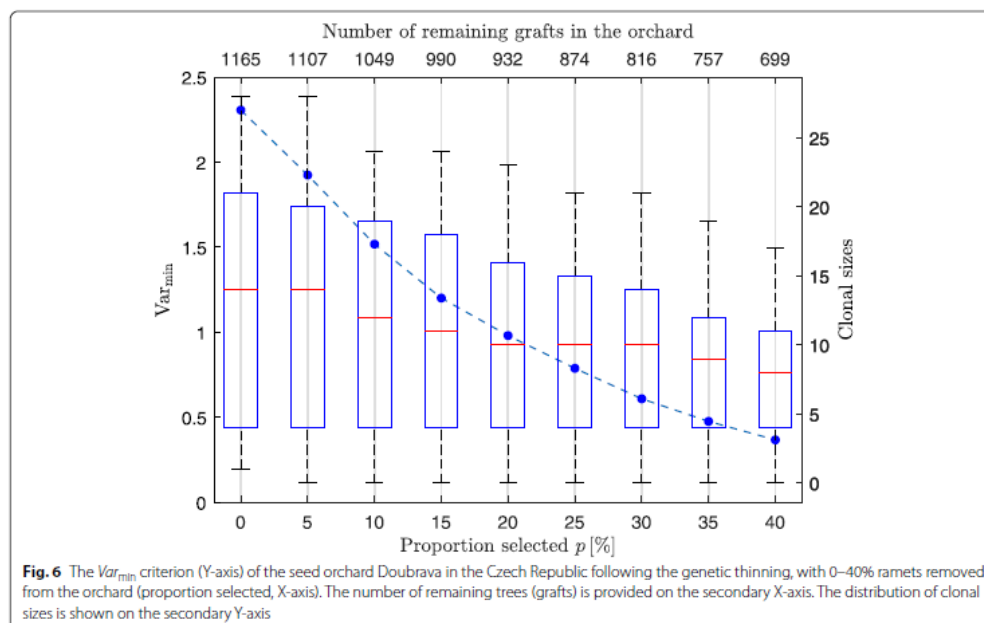
16	23	17	1	4	39	37	4	31	7	25	40	15	31	6	28	27	24	11	12
2	20	9	33	32	13	12	26	17	24	39	26	13	29	33	22	14	37	29	25
30	11	8	37	34	22	8	36	34	21	9	16	38	20	21	26	5	36	1	10
15	19	6	18	38	15	7	30	4	27	32	3	24	19	28	2	18	27	40	3
32	14	7	10	17	5	12	28	29	23	31	18	13	23	34	35	15	16	6	12
8	38	2	32	30	16	1	18	39	5	11	21	30	1	14	10	21	25	35	38
23	25	36	6	26	11	22	20	6	34	40	38	39	31	12	20	37	3	33	27
22	35	9	19	10	24	36	31	25	4	9	28	8	2	19	17	22	19	39	10
4	5	29	22	40	28	16	10	38	18	14	13	17	27	3	35	39	11	4	8
24	32	28	2	37	7	33	13	23	33	40	25	11	14	30	20	32	3	7	35
12	15	9	31	1	15	36	3	5	30	24	32	29	16	34	7	26	23	37	13
23	21	36	35	26	6	34	8	21	6	17	8	40	31	12	29	27	12	6	27
1	40	11	28	24	1	16	37	14	29	3	15	20	4	9	33	2	20	25	28
38	35	17	37	19	8	4	15	39	36	22	10	5	7	2	24	13	5	3	30
19	16	2	18	25	27	30	38	24	23	21	19	9	26	21	4	18	27	40	9
5	25	14	1	7	22	26	14	31	34	17	1	13	25	33	11	10	34	20	23
17	39	32	10	39	34	17	40	33	8	29	36	30	22	12	5	28	13	35	15
13	6	2	36	12	9	38	7	6	23	18	19	32	18	38	32	31	21	7	29
11	15	4	3	14	21	27	11	14	35	26	33	16	20	37	30	35	19	16	3
33	20	28	26	18	39	31	1	5	37	36	10	9	22	29	40	2	8	34	24

Fig. 4 The ONA seed orchard layout with 20% genetic thinning (black cells) following the linear deployment (ONA, GTL deployment)

16	23	17	1	4	39	37	4	31	7	25	40	15	31	6	28	27	24	11	12
2	20	9	33	32	13	12	26	17	24	39	26	13	29	33	22	14	37	29	25
30	11	8	37	34	22	8	36	34	21	9	16	38	20	21	26	5	36	1	10
15	19	6	18	38	15	7	30	4	27	32	3	24	19	28	2	18	27	40	3
32	14	7	10	17	5	12	28	29	23	31	18	13	23	34	35	15	16	6	12
8	38	2	32	30	16	1	18	39	5	11	21	30	1	14	10	21	25	35	38
23	25	36	6	26	11	22	20	6	34	40	38	39	31	12	20	37	3	33	27
22	35	9	19	10	24	36	31	25	4	9	28	8	2	19	17	22	19	39	10
4	5	29	22	40	28	16	10	38	18	14	13	17	27	3	35	39	11	4	8
24	32	28	2	37	7	33	13	23	33	40	25	11	14	30	20	32	3	7	35
12	15	9	31	1	15	36	3	5	30	24	32	29	16	34	7	26	23	37	13
23	21	36	35	26	6	34	8	21	6	17	8	21	31	12	29	27	12	6	27
1	40	11	28	24	1	16	37	14	29	3	15	20	4	9	33	2	20	25	28
38	35	17	37	19	8	4	15	39	36	22	10	5	7	2	24	13	5	3	30
19	16	2	18	25	27	30	38	24	23	21	19	9	26	21	4	18	27	40	9
5	25	14	1	7	22	26	14	31	34	17	1	13	25	33	11	10	34	20	23
17	39	32	10	39	34	17	40	33	8	29	36	30	22	12	5	28	13	35	15
13	6	2	36	12	9	38	7	6	23	18	19	32	18	38	32	31	21	7	29
11	15	4	3	14	21	27	11	14	35	26	33	16	20	37	30	35	19	16	3
33	20	28	26	18	39	31	1	5	37	36	10	9	22	29	40	2	8	34	24

Fig. 5 The ONA seed orchard layout with 30% genetic thinning (black cells) following the Linear Deployment (ONA, GTL deployment)

Several assumptions (limitations) are related to determining optimum clonal proportions (vector REMOVE). (1.) Presence of pair-wise and self-coancestries expel the problem from linear formulation, and complications may arise with singularities of the quadratic constraint. (2.) Deriving optimum clonal proportions from breeding



values relies on somewhat arbitrary weighting (e.g., see constant  $c$  in the “Model and mathematics” section in Lindgren and Matheson 1986). (3.) Breeding values are typically treated as constants in calculating optimum proportions in animal and plant breeding (e.g., Meuwissen 1997). However, they are statistical predictions of cumulative additive gene effects. (4.) Genetic gain is the product of clonal proportions and the respective breeding values conditional on random mating (equal likelihood of mating among all genetic entries across the grid). (5.) Actual gametic contributions differ from calculated “ideal” proportions (complex reproductive biology in variable environmental conditions). Most of the above issues are equally relevant in spatial layout optimization.

Next, we discuss specific assumptions of the presented methodology (genetic thinning utilizing the ONA criterion function). The algorithm utilizes local heuristics. Therefore, reaching the true optimum is not guaranteed. However, Chaloupková et al. (2016) derived theoretical minimum variance, which can be used as a reference optimality measure. While we focused exclusively on the same clone’s adjacencies, further penalties could be introduced to trace pair-wise genetic relationships across adjacent positions (assumption 1. above). Each would be given a separate weight. One may set up relative weights using the genetic coancestry, i.e., the equivalent of the “flow” matrix

$C$  in the Minimum Inbreeding scheme (Lstibůrek and El-Kassaby 2010, pp. 604). As stated in the methodical section, no distributional assumptions exist on REMOVE and ORCHARD. They are assumed to be calculated error-free (assumptions 2. and 3.). Provided the premise of preferential mating among neighboring individuals holds (i.e., spatially constrained pollen dispersion, see Funda and El-Kassaby 2013), random mating should be evaluated in proximity, e.g., nine adjacent positions as presented here (assumption 4.). Higher intensity of genetic thinning unavoidably produces multiple adjacent empty blocks, as seen in Fig. 5. Should this be of concern, an extra penalty can be integrated into the objective function (Eq. 1). The  $Var_{min}$  could be calculated across a broader range, considering more distant neighborhood positions. Information on reproductive biology and its dynamics may streamline the optimization protocol (assumption 5.). In practical terminology, layouts are established for the entire lifespan of seed orchards, and they are never considered ideal, given the ever-present reproductive variation.

## 5 Conclusion

Breeders conduct genetic thinning in seed orchards by removing genetically inferior trees from the grid after their genetic merit is evaluated in progeny trials. This operation enhances the genetic worth of seed orchards’ crop,

promoting productivity and quality of newly established forest plantations. This study demonstrates that genetic thinning could be spatially optimized. The original algorithm provides breeders clear information on what exact trees should be removed from the grid. In addition, incorporating the objective function of the Optimum-Neighborhood Allocation, the method enhances random mating (panmixia). As shown in a real-world example, this implementation can significantly improve original, less efficient spatial layouts. Breeders can use the R package that accommodates any seed orchard configuration. Efficient seed orchard management depends on further research and innovation to address specific reproductive biology in forest tree species under changing environmental conditions.

#### Code availability

Readers can access our R package `thinONA` and optimize genetic thinning using their input variables (existing seed orchard layout and the vector `REMOVE`). The function identifies specific trees on the grid that should be removed from the orchard. The R package is available (with documentation) at the OSF repository: <https://osf.io/yg85m/> DOI 10.17605/OSF.IO/YG85M. Additional R package `OrchSTAT` (referenced in the text) is available on the same website.

Breeders are encouraged to modify the presented R code as needed, or they may contact the corresponding author for assistance. Prof. Lindgren provides his software tool implementing the Linear Deployment algorithm at: [http://daglindgren.upsc.se/Breed\\_Home\\_Page/Linear\\_deployment/LINEAR\\_DEPLOYMENT\\_Menu.html](http://daglindgren.upsc.se/Breed_Home_Page/Linear_deployment/LINEAR_DEPLOYMENT_Menu.html).

#### Authors' contributions

M. L. designed the research. K. Ch. and M. L. developed the methodology, K. Ch. conducted computer simulations and analyzed the data, M. L. programmed the R package, K. Ch. and M. L. wrote the manuscript. Both authors read and approved the final manuscript.

#### Funding

The research leading to these results has received funding from the EEA/Norway Grants 2014-2021 and the Technology Agency of the Czech Republic. Both authors were partially supported by grant "EXTEMIT-K", CZ.02.1.01/0.0/0.0/15\_003/0000433 financed by OP RDE.

#### Availability of data and materials

The simulation datasets generated and analyzed in the current study and the actual layout of the seed orchard Doubrava are available from the corresponding author on request.

#### Declarations

##### Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

##### Consent for publication

All authors gave their informed consent to this publication and its content.

##### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 6 January 2022 Accepted: 17 August 2022

Published online: 01 September 2022

#### References

- Bondesson FL, Lindgren D (1993) Optimal utilization of clones and genetic thinning of seed orchards. *Silvae Genet* 42:157–163
- Burczyk J, Prat D (1997) Male reproductive success in *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco: the effects of spatial structure and flowering characteristics. *Heredity* 79:638–647
- Chaloupková K, Stejskal J, El-Kassaby YA, Frampton J, Lstibůrek M (2019) Current advances in seed orchard layouts: two case studies in conifers. *Forests* 10:1–6
- Chaloupková K, Stejskal J, El-Kassaby YA, Lstibůrek M (2016) Optimum neighborhood seed orchard design. *Tree Genet Genomes* 12:105
- Chen X, Sun X, Dong L, Zhang S (2018) Mating patterns and pollen dispersal in a Japanese larch (*Larix kaempferi*) clonal seed orchard: a case study. *Sci China Life Sci* 61:1011–1023
- El-Kassaby YA, Fayed M, Klápště J, Lstibůrek M (2014) Randomized, replicated, staggered clonal-row (R<sup>2</sup>SCR) seed orchard design. *Tree Genet Gen* 10:555–563
- Falconer DS, Mackay TFC (1996) Introduction to quantitative genetics. Longmans Green, Harlow, Essex, UK, p 464
- Funda T, El-Kassaby YA (2013) Seed orchard genetics. *Plant Sci Rev* 2012:21–43
- Funda T, Lstibůrek M, Lachout P, Klápště J, El-Kassaby YA (2009) Optimization of combined genetic gain and diversity for collection and deployment of seed orchard crops. *Tree Genet Gen* 5:583–593
- Giertych M (1975) Seed orchard designs. Forestry Commission Bulletin 54. HMSO, London, pp 25–37
- Hodge GR, White TL (1993) Advanced-generation wind-pollinated seed orchard design. *New Forests* 7:213–236
- Kaňák J (2011) Návrh šlechtitelských postupů pro borovici lesní v západních a jižních Čechách (Project of breeding strategies for Scots Pine in the Western and Southern Bohemia). Ph.D. dissertation. Faculty of Forestry and Wood Sciences. Czech University of Life Sciences Prague, Czech Republic, 148
- Liesebach H, Liepe K, Bäucker C (2021) Towards new seed orchard designs in Germany – a review. *Silvae Genet* 70:84–98
- Lindgren D, Matheson AC (1986) An algorithm for increasing the genetic quality of seed from seed orchards by using the better clones in higher proportions. *Silvae Genet* 35:173–177
- Lstibůrek M (2022) Spatial optimization of genetic thinning in seed orchards. OSF repository. V1. <https://osf.io/yg85m/>
- Lstibůrek M, El-Kassaby YA (2010) Minimum-inbreeding seed orchard design. *For Sci* 56:603–608
- Meuwissen THE (1997) Maximizing the response of selection with a predefined rate of inbreeding. *J Anim Sci* 75:934–940
- Prescher F, Lindgren D, Karlsson B (2008) Genetic thinning of clonal seed orchards using linear deployment may improve both gain and diversity. *Forest Ecol Manage* 254:188–192
- R Core Team (2022) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- White TL, Adams WT, Neale DB (2007) Forest genetics. CAB International, Wallingford, Oxfordshire, UK, p 682

#### Publisher's note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## 5.4. Využití nástrojů ONA v lesnické praxi

Kromě případové studie pro semenný sad jedle bělokoré (*Abies alba*), uvedené ve zde prezentované publikaci (Chaloupková a kol. 2019), byl ONA využit pro řešení mnoha dalších situací pro zakládání semenných sadů a doplnění stávajících výsadeb v ČR i ve světě.

Byly navrženy designy pro tyto sady: sady na lokalitě Rezek a Haida ve spolupráci KRNAP (2021), borovice lesní a smrk ztepilý (2018), akácie Mearnsova (*Acacia mearnsii* De Wild.) ve spolupráci s Institute for Commercial Forestry research JAR (2019).

V případě doplňování výsadeb se jednalo jmenovitě např. o tyto semenné sady: jeřáb břek (*Sorbus torminalis* (L.) Crantz) v roce 2018, borovice lesní lokalita Eliškova louka v roce 2017 a 2018, smrk ztepilý na lokalitě Osina v roce 2019, smrk ztepilý lokalita Lišice v roce 2018, borovice lesní na lokalitě Višňová v roce 2021 a 2022 (Obr.1). Pro řešení těchto zadání byly jedinci pro doplnění volných pozic vybíráni s ohledem na jejich dostupnost v zásobě a jejich zastoupení v stávající výsadbě. Cílem vždy bylo, aby byly velikosti klonů ve výsledném schématu co nejvyrovnanější.

Příklad založeného semenného sadu je zobrazen na Obr.1. Jedná se o Akácii Mearnsovu. Sad byl založen ve spolupráci s Institute for Commercial Forestry research v Jihoafrické republice. Schéma mělo 709 pozic a nepravidelný tvar. Zahrnovalo 30 klonů a přibližně stejné velikosti. Klony jsou vyznačeny barevně a pomocí číselného id.

Příklad doplnění stávající výsadby je uveden na Obr.2. Jednalo se o sad borovice lesní na lokalitě Višňová v majetku Lesů ČR. V semenném sadu čítajícím 406 pozic bylo v roce 2022 doplněno 46 pozic pomocí ONA. Zeleně jsou vyznačeny klony, které plodí, bíle klony, které neplodí, červeně klony, které uhynuli ale bylo možné je doplnit ze stávající zásoby a žlutě klony které byly vybrány nově na základě inventury a rozmístěny pomocí ONA. Klony jsou značeny příslušným ID.

O dalším využití ONA schématu a souvisejících softwarových nástrojů jsme příležitostně informováni, například při návštěvě Michigan State University, emailovou komunikací s kolegy z Japonska, Španělska, Norska, Rakouska, Německa, Austrálie, Kanady, Jižní Koreje a dalších zemí. Detailní přehled o reálném využití komplikuje skutečnost, že je software volně dostupný ke stažení a uživatelé nás obvykle nekontaktují, tj. o využití se většinou dozvíme nepřímo, event. v případě konzultací, kdy se na nás uživatelé obracejí s doplňujícími dotazy.





## 5.5. Nástroj pro asortativní křížení s využitím ONA

Zde uvádím výsledky modelového příkladu pro ověření funkčnosti preferenčního křížení v rámci ONA. Tento výstup není součástí žádné z uvedených publikací, ale tematicky soubor výsledků doplňuje. Tabulka č.3. uvádí výsledky pro testování funkčnosti ONA algoritmu při řešení úloh zahrnující asortativní křížení. Je patrné, že váha separace mezi dvojicí klonů ID1 a ID2 a dvojicí ID3 a ID4 ovlivnila následný počet přímých sousedství ve výsledném schématu mezi těmito klony. Dvojice jsou ve schématech barevně zvýrazněny. Pro porovnání, do jaké míry k tomuto ovlivnění došlo je zde uvedena i hodnota průměrného počtu sousedství mezi ostatními dvojicemi klonů. Pro možnost posouzení efektivity parametru separace těchto dvojic klonů nebyly do výpočtu průměru zahrnuty dvojice s penalizovanými klony 1, 2, 3 a 4. Tato penalizace ovlivnila i výskyt sousedství penalizovaných klonů (1-4) s ostatními klony (5-6).

**Tab. 3.** Výsledky testování ONA asortativního křížení na 6 scénářích. Uvedeny jsou váhy separace mezi dvěma dvojicemi vybraných klonů a mezi ostatními klony, počty sousedství mezi těmito dvojicemi klonů ve výsledném schématu a průměr počtů sousedství mezi ostatními dvojicemi klonů.

Scénář	Váha separace mezi ID1/ID3	Váha separace mezi ID3/ID4	Váha separace pro ostatní klony	Sousedství mezi ID1/ID2	Sousedství mezi ID3/ID4	Průměr sousedství mezi ostatními klony
1	0,1	0,5	1	7	5	4,4
2	0,5	1	1	6	3	4,27
3	1,5	1	1	1	3	4,33
4	1,5	2	1	1	3	4,6
5	0,5	1,5	1	7	2	4,4
6	1	1	1	4	4	4,33

V rámci scénáře č. 1, kdy byla míra pozitivní separace nastavena jako nejvyšší pro obě dvojice klonů (0,1 a 0,5) byl výsledek ovlivněn značně. To je zřejmé i vizuálně, ze samotného výsledného schématu pro toto zadání (Obr. 3). Klony číslo 1 a 2 jsou v tomto případě umístovány do bezprostřední blízkosti. Klony číslo 2 a 3 jsou také umístovány do blízkosti s vyšší frekvencí, než jaký je průměr všech ostatních dvojic klonů, který je roven 4,25 (Tab. 3).

7	1	7	3	8	9	8	10	4	8
2	6	2	5	10	6	4	5	7	3
1	8	1	3	7	8	3	6	1	10
9	2	4	9	5	4	9	2	4	3
10	5	7	6	1	2	10	7	9	6
6	9	2	4	10	5	1	8	3	5

**Obr. 3.** Výsledné schéma pro scénář č. 1, pro hodnotu separace dvojice klonů 1 a 2 rovnou 0,1 a pro dvojici klonů 3 a 4 rovnou 0,5.

Pro scénář 2 i scénář 3 byla penalizací zatížena vždy jen dvojice klonů ID1/ID2. V prvním případě se jednalo o pozitivně asortativní a ve druhém o negativně asortativní křížení. Tomu odpovídá i počet sousedství ve schématu, který je roven 6, resp. 1. To je významný rozdíl oproti zjištěnému průměrnému počtu sousedství blízcímu se 4. V rámci scénáře číslo 4 (Obr. 4) byla míra negativní separace nastavena jako nejvyšší, což se opět promítlo do výsledného počtu sousedství mezi zatíženými dvojicemi klonů a rozdílu oproti průměrnému počtu přímých sousedství mezi ostatními dvojicemi (Tab. 3).

1	10	2	5	4	8	7	2	7	10
5	8	6	8	7	2	10	3	8	6
1	9	3	5	6	5	9	5	2	4
10	6	7	1	4	2	8	3	6	9
3	4	8	9	7	1	10	9	5	1
9	1	3	2	4	3	6	7	10	4

**Obr. 4.** Výsledné schéma pro scénář č. 4 pro hodnotu separace dvojice klonů 2 a 1 rovnou 1,5 a pro dvojici klonů 3 a 4 rovnou 2.

7	8	3	5	6	4	1	4	10	6
3	6	10	1	7	9	2	7	8	4
9	2	5	4	2	3	5	10	9	5
10	1	3	8	5	9	1	4	7	10
6	7	2	9	2	7	6	2	6	9
3	10	8	1	8	5	1	8	3	4

**Obr. 5.** Výsledné schéma pro scénář č.5 pro hodnotu separace dvojice klonů 1 a 2 rovnou 0,5 a pro dvojici klonů 3 a 4 rovnou 1,5.

Scénář 5 zahrnoval pozitivní asortativní křížení pro dvojici klonů 1 a 2 (penalizace 0,5) a negativní asortativní křížení pro dvojici 3 a 4 (penalizace 1,5). To se opět promítlo do výsledných počtů přímých sousedství v rámci dvojic a mezi ostatními klony (Tab. 3). Stejně tak je to patrné v samotném schématu (Obr. 5). Zde spolu klony 1 a 2 sousedí s vysokou četností, zatímco klony 3 a 4 s nízkou četností.

Do modelového řešení byla zahrnuta i situace bez asortativního křížení (scénář 6). Výsledné schéma je uvedeno na Obr. 6.

9	8	2	10	6	3	8	3	5	4
1	7	4	9	8	10	1	2	9	1
2	9	3	6	4	7	3	6	7	5
10	1	4	2	1	8	10	1	4	3
5	7	5	8	5	9	5	6	10	7
6	2	6	3	4	10	7	8	9	2

**Obr. 6.** Schéma bez zahrnutí preferenčního křížení.

V rámci všech zadání byla úspěšně eliminována sousedství mezi rametami téhož klonu. Zároveň bylo optimálního výsledku dosaženo až při relativně vysokém počtu iterací. To je pro tato specifická zadání způsobeno faktem, že optimální řešení bylo v tomto případě možno nalézt jen s použitím náhodného vyplňování matice sadu. Výsledné hodnoty kriteriální funkce byly zatíženy zahrnutím asortativního křížení (Tab. 4). Hodnota kriteriální funkce je proto nejnižší pro scénář 6. Funkčnost algoritmu pro asortativní křížení byla ověřena i pro větší typy zadání, jejichž výsledky zde nejsou vedeny.

**Tab. 4.** Výsledné hodnoty kriteriální funkce při porovnávání různých intenzit separace zvolených dvojic klonů. Příslušné číslo iterace, ve které došlo k nalezení optimálního řešení.

Scénář	Kriteriální funkce	Číslo iterace
1	1,1	240
2	0,77	289
3	0,72	204
4	0,74	118
5	0,99	213
6	0,61	65

## 5.6. Specifické podmínky křížení

Algoritmus ONA ve své základní verzi optimalizuje pouze 8 nejbližších pozic, které mají při optimalizaci stejnou váhu. ONA ale umožňuje některým sousedním pozicím přiřadit vyšší váhu, nebo rozšířit optimalizované okolí. Toho bylo využito při řešení modelového příkladu semenného sadu pro vyrovnání specifických poměrů na dané lokalitě. V tomto případě se může jednat o směr převládajícího větru, nebo umístění úlů pro opylovače. Z tohoto důvodu byla pro modelový příklad třem sousedstvím (horizontální a 2 diagonální) ve směru zleva doprava

přiřazena dvojnásobná váha. Sad byl tvořen nepravidelným sadem o 119 pozicích s extrémně nevyrovnanými velikostmi klonů. Výsledné schéma bylo vytvořeno pomocí 100 nezávislých iterací (Obr. 7). Stejný přístup je aplikovatelný pro semenné sady s nerovnoměrným sponem. Tento výstup není součástí publikovaných článků, ale příkladem další možnosti využití ONA přístupu. Dále je možné do algoritmu zahrnout různé velikosti optimalizovaného okolí. Funkčnost algoritmu byla ověřována při zahrnutí různého počtu přímých sousedství. Konkrétně se jednalo o 3 varianty, a to se 4, 8 (standardní verze ONA) a 12 optimalizovanými okolními pozicemi.

					9	1	11	1	2	1	17	1	15	13	7	14	6	18	5	1	2			
				4	2	18	7	10	8	18	14	18	10	5	6	8	10	4	3	11	4			
		8	20	3	8	1	2	12	9	19	1	11	3	2	17	9	20	1	6	1	2			
	11	12	5	7	2	11	17	3	15	6	2	13	9	4	10	16	12	3	9	7	18	3	7	5
	1	8	2	6	1	7	2	12	19	11	20	5	17	7	19	5	1	8	5	12	6	16	11	15
10	9	12	16	10	3	9	10	6	4	1	6	2	4	8	10	9	13	17	11	2	1	12	14	2
2	6	7	13	11	1	19	5	8	2	12	10	15	1	12	3	2	1	19	20	7	5	8		
11	8	15	4	9	14	16	12	1	6	3	1	20	9	2	7									
3	2	13	1	5	4	10	4	2	16	4	14	2												

**Obr. 7** Výsledné schéma pro modelový příklad řešení specifických podmínek křížení. Zahrnutí předpokladu převládajících větrů ve směru od západu k východu do optimalizace prostorového rozvržení semenného sadu s využitím ONA.

## 5.7. Softwarová řešení

Při vývoji všech výše zmíněných nástrojů byla zohledněna i nutnost zpřístupnit je praxi. Byly vytvořeny originální uživatelsky přátelské nástroje: OrchONA a OrchSTAT. Tyto nástroje jsou dostupné na <https://home.czu.cz/1stiburek/software>. Konečný uživatel si může vybrat podle svých preferencí, zda bude využívat samotný R balíček, nebo zvolí variantu s Excelovským rozhraním. V rámci R balíčku je možné kód dále optimalizovat podle vlastních potřeb.

OrchONA je balíček knihovny R. Pomocí tohoto balíčku je možné vytvářet základní typ ONA schémat semenných sadů. V rámci balíčku byly vytvořeny i pomocné soubory (s instrukcemi pro uživatele). Pro spuštění tohoto balíčku je nutné stažení R a Java a příslušných souborů. Proces se spouští přes MS Excel, kde jsou zadávány jak vstupy, tak generovány výstupy. Vstupy pro tento balíček jsou matice definující plochu semenného sadu a matice udávající ID každého klonu a počet ramet na klon. Ostatní parametry optimalizace jsou nastaveny defaultně (počet iterací = 100, penalizace = 1000, systematické vyplňování mřížky

sadu, generátor náhodných čísel 12345), lze je ale změnit v samotném kódu. Výstupem optimalizace je schéma semenného sadu a matice příslušných přímých sousedství.

OrchSTAT je taktéž R balíček. Je možné jej použít k hodnocení prostorového uspořádání již existujících schémat. Pro použití tohoto nástroje byly taktéž vytvořeny pomocné soubory s instrukcemi pro uživatele. Nástroj hodnotí míru panmixie a inbrídingu. Pro jeho použití je potřeba R, Java a MS Excel a samotný balíček. Vstupy i výstupy jsou zadávány a generovány do MS Excel. Vstupy jsou matice definující plochu sadu, matice udávající ID každého klonu přítomného v daném sadu a počet ramet na klon příslušného klonu a samotné schéma sadu s příslušnými ID klonů. OrchSTAT vypočte parametry  $var_{min}$  a  $d_{min}$  a koeficient variance pro zadané schéma. Dále definuje tyto parametry včetně jejich směrodatných odchylek pro 100 iterací znáhodněného schématu o stejných vstupních parametrech. Hodnocení schématu tak může proběhnout jednak na základě daných parametrů, tak porovnáním těchto parametrů se znáhodněným schématem.

Dalším výstupem je R balíček thinONA. Tento nástroj umožňuje provádět genetickou probírku v semenném sadu s ohledem na prostorové rozmístění jedinců. Balíček neošetřuje výběr klonů určených k probírce (k tomu lze využít nástroje prof. Lindgrena). Výstupem thinONA je parametr  $var_{min}$  a příslušné schéma semenného sadu.

Veškerý software je dostupný v knihovně R a také na webových stránkách: <https://katedry.czu.cz/en/kgfld/software> nebo na <https://osf.io/yg85m/files/osfstorage>.

## **6. Diskuse a doporučení pro praxi**

Limitace ONA přístupu byly shrnuty v Chaloupková a kol. (2016). Stejné limity platí pro všechny nástroje vycházející z ONA. Výsledkem těchto limitů je například jistá systematickosti genetické probírky při jejích vyšších intenzitách. Tento problém je možné řešit např. rozšířením optimalizovaného okolí na větší počet pozic. Stejný problém, co do systematickosti schématu nastává i v případě, kdy je při tvorbě schématu neúměrně rozšířeno optimalizované okolí každé pozice. Takové rozšíření na např. 16, nebo 20 okolních pozic může být v některých situacích odůvodněné, avšak s rostoucími velikostmi klonů a se zmenšující se velikostí schématu může vést k vytvoření nežádoucího prostorového vzorce. Tyto hranice by bylo možné podrobit dalšímu zkoumání a jejich rozšíření by v některých případech mohlo být výhodné. Pro účely všech prací však bylo pracováno s okolím 8 pozic a pro praktické využití koncovým uživatelem v běžných situacích se tento počet zdá být dobře aplikovatelný.

Obecně se vychází z předpokladu, že optimalizace prostorového uspořádání semenného sadu by měla být založena na dvou požadavcích, a to náhodnosti křížení a zamezení inbreedingu. Samotnou randomizací schématu však není možné splnit oba tyto požadavky. To je patrné na výsledných grafech č. 4 a 5 (Chaloupková a kol. 2016). Grafy zobrazují, že randomizované schéma nezaručí omezení inbredního křížení. MI design (Lstibůrek a kol. 2015) tento požadavek ovšem zajistí velice efektivně, avšak nepracuje s požadavkem na náhodnost křížení. Je patrné, že ONA design zaujímá místo mezi těmito dvěma přístupy. Ve výsledném schématu nejsou vytvářeny žádné pravidelné vzorce a zároveň dochází ke kontrole inbreedingu.

Použití klonových řad je kontroverzní přístup. V některých případech je však možné takto postupovat díky biologickým specifikům určitých druhů. Konkrétně u jehličnanů to umožňuje nízká míra samosprašení. Hlavním argumentem pro takový design je zjednodušení dalšího obhospodařování semenného sadu. Je možné tak významně zefektivnit a zlevnit kontrolované křížení (El-Kassaby 1995; O'Connell 2003). V publikaci Chaloupková a kol. (2019) jsou klonové řady řešeny pomocí MI designu (Latibůrek a El-Kassaby 2010). Tento přístup se ukázal efektivním v situaci, kdy mezi částí klonů existují příbuzenské vazby. Koncept klonových řad by však bylo možné použít i pro nepříbuzné klony v celé ploše sadu a aplikovat jej přímo na metodiku ONA. Aktuální forma ONA designu toto použití umožňuje. Lze předpokládat, že takový design by dosáhl kvalit standardního ONA designu.

V publikaci zaměřené na genetickou probírku (Chaloupková a kol. 2022) je prezentováno, že je možné genetickou probírku optimalizovat nejen z pohledu počtu klonů (Lindgren a Matheson 1986, Bondesson a Lindgren 1993, Lindgren 1993, Prescher a kol. 2008),

ale i z pohledu rozmístění jedinců na ploše. Po provedení genetické probírky se předpokládá, že genetická hodnota osiva je determinována součinem relativního zastoupení klonů a jejich šlechtitelskými hodnotami. Toto očekávání je však podmíněno náhodným křížením všech jedinců. Za předpokladu, že rozptyl pylu je prostorově omezen je pak i v tomto případě hodnoceno především nejbližší sousedství všech pozic (Funda a El-Kassaby 2013).

V praxi se můžeme setkat se situací, kdy např. část klonů neplodí a u části klonů byla zároveň prokázána nízká šlechtitelská hodnota. V takovém případě je často aplikována genetická probírka s vysokou intenzitou. Aktuálně ale není dostupný žádný nástroj, který by umožňoval dodatečné vylepšení takto ošetřených semenných sadů. Takové doplnění novými jedinci s ohledem na již existující rozmístění by bylo možné provést právě pomocí ONA nástroje (Chaloupková a kol. 2016). Komplexní metodika, kdy by byl nejprve použit ONA pro genetickou probírku (Chaloupková a kol. 2022) a následně ONA nástroj pro doplnění semenného sadu (Chaloupková a kol. 2016) zatím nebyl prostudován a publikován. Lze předpokládat, že takové použití ONA algoritmu by vedlo k významnému zlepšení kvality prostorového schématu semenného sadu, byť reálné využití je limitováno časovým odstupem pro dosažení plné plodnosti doplněných roubovanců.

ONA metoda by mohla být kromě zmíněných přístupů použita i pro rychlé začlenění vysoce hodnotných genotypů do lesnického provozu. Některé hodnotné populace mnohou trpět nízkou genetickou diverzitou. Jejich zahrnutím do existujících výsadeb semenných sadů by mohla být tato překážka překonána. ONA genetická probírka by mohla být prvním krokem při takovém postupu. Následné rozmístění nových genotypů by mohlo být provedeno taktéž s využitím ONA (Chaloupková a kol. 2022). Intenzita takové genetické probírky by mohla být určena očekávaným výsledným genetickým ziskem (Yamada a kol. 1975).

Intenzivní genetická probírka vede ke ztrátám co do kvantity produkce osiva. Velmi intenzivní probírka může také v některých případech způsobit nárůst parametru  $var_{min}$  (Chaloupková a kol. 2022). Šlechtitelé by si měli být těchto efektů vědomi a zvážit tak použití genetické probírky. Lze zvážit urychlení šlechtitelského cyklu použitím např. časných testů potomstev, nebo genomických metod, kterými lze zcela předejít nutnosti dodatečné genetické probírky v semenném sadu. Genetická probírka může být naopak velice přínosná ve šlechtitelských programech s omezenými finančními zdroji a dlouhým generačním intervalem. Takové programy operují s velkým množstvím genotypů, které mohou být efektivně optimalizovány. Lze předpokládat, že v případě méně efektivních designů dojde použitím ONA genetické probírky spíše ke snížení parametru  $var_{min}$ . Šlechtitel může eventuální přínos pro konkrétní sad posoudit jednoduše pomocí dostupného nástroje OrchSTAT. Provedené studie

ukázaly, že genetická probírka v kombinaci s LD přístupem (Lindgren a Matheson 1986) výrazně snižuje  $\text{var}_{\text{min}}$  i při intenzitě probírky 25%. Takovou intenzitu je možné aplikovat i v praxi. Samozřejmě je tak dosaženo vyššího genetického zisku při dané efektivní velikosti populace. Pro optimalizaci genetického zisku a efektivní velikosti populace je možné kromě standardního LD protokolu využít také novějšího optimalizačního přístupu autorů Funda a kol. (2009). Předpokládáme ale, že využití tohoto přístupu by významně neovlivnilo výsledky prostorové optimalizace genetické probírky.

Z pohledu zamezení negativnímu vlivu samosprášení je v praxi nejvýhodnější a nejčastější sousedství jakkoli příbuzných klonů zcela eliminovat. Samozřejmě se však můžeme setkat se situací, kdy to není zcela možné. V teoretické rovině je pak možné takových scénářů vytvořit velké množství. Poté je optimální některým sousedstvím určitých dvojic klonů přiřadit vyšší váhu penalizace než jiným. Takový postup může být např. alternativou k hybridnímu schématu, tak jak bylo prezentováno v Chaloupková a kol. (2019). Dále by bylo možné tento postup prověřit na modelových příkladech s reálnými daty.



## **7. Závěr**

V této disertační práci a příslušných publikacích je popsán model, který představuje možnosti řešení prostorového rozmístění jedinců v semenných sadech pomocí ONA algoritmu ve specifických situacích. Jedná se o samotný ONA design a jeho samostatné využití, či využití v kombinaci s MI designem. Výsledky takové aplikace jsou porovnávány s dalšími existujícími designy z pohledu panmixie a minimalizace inbreedingu. Dále je prezentován postup pro vylepšování stávajících sadů. Genetická probírka s využitím ONA je demonstrována na modelových i reálných datech. Práce také představuje v současnosti dostupné softwarové nástroje. Stejně tak jsou prezentovány další zatím nepublikované, avšak na teoretické rovině již prověřené možnosti využití ONA. Je zde k dispozici i souhrn lokalit kde byl ONA design již použit v praxi. Všechny prezentované možnosti využití podporují panmixii křížení prostřednictvím vyrovnávání počtů přímých sousedství mezi všemi klony. Na závěr práce jsou diskutovány další možnosti využití a rozšíření algoritmu.

## 8. Zdroje

1. Anderson W. (1999), Gain and diversity in multi-generation breeding programs. Umeå: Swedish University of Agricultural Sciences, ISBN 91-576-5629-0
2. Annala M. L. (2003), Seed Production of Birch (*Betula pendula*) in a Plastic Greenhouse at Haapastensyrja Tree Breeding Station. Presentation as a consultant of Lannen Tehtaat Inc. in Peoples' Republic of China, 13-24 April 2003
3. Bell G. D., Fletcher A. M. (1978), Computer organised orchard layouts (COOL) based on the permuted neighbourhood design concept. *Silvae Genet* 27:223–225
4. Bilgen, B. B., A., Murat A. Y. K. (2013), Importance of effective clone number in seed orchards: a comparative study on seven conifer species in Turkey. *Šumarski list* 5-6, 297–305 s
5. Bondesson F. L., Lindgren D. (1993), Optimal utilization of clones and genetic thinning of seed 210 orchards. *Silvae Genet* 42:157-163 211
6. Burczyk J., Adams W. T., Schmitzu A. Y. (1996), Mating patterns and dispersal in a natural knobcone pine (*Pinus attenuata* Lemmon.) stand. *Heredity* 77, 251–260 s
7. Burczyk J. a Prat D. (1997), Male reproductive success in *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco: The effects of spatial structure and flowering characteristics. *Heredity*. 79. 638-647. 10.1038/sj.hdy.6882600
8. Češka P. (2014), Zakládání a rozvoj semenných sadů lesních dřevin u VLS ČR, S. P. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, disertační práce, 154 s
9. El-Kassaby Y. A., Ritland K., Fashler A. M. K., Devitt W. J. B. (1988), Therole of reproductive phenology upon the mating system of a Douglas-fir seed orchard. *Silvae Genetica* 37, 76–82 s
10. El-Kassaby Y. A., Reynolds S. (1990), Reproductive phenology, parental balance, and supplemental mass pollination in a sitka-spruce seed-orchard. *Forest Ecol. Manag.* 31, 1–2
11. El-Kassaby Y. A. (1995), Evaluation of the tree-improvement delivery system: factors affecting genetic potential. *Tree Physiol* 15:545–550
12. El-Kassaby Y. A. (2003), Clonal-row vs. random seed orchard designs: mating pattern and seed yield of western hemlock (*Tsuga heterophylla* (Raf.) Sarg.) *For Genet* 10:121–127
13. El-Kassaby Y. A., Stoehr M.U., Reid D., Walsh, C.G., Lee T. E. (2007), Clonal-row vs. random seed orchard designs: Interior spruce mating system evaluation. *Can. J. For. Res.*, 37, 690–696

14. El-Kassaby Y. A., Lstibůrek M. (2009), Breeding without breeding. *Genet. Res.*, 91, 111–120
15. El-Kassaby Y. A., Fayed M., Klápště J., Lstibůrek M. (2014), Randomized, replicated, staggered clonal-row (R2SCR) seed orchard design. *Tree Genet Genomes* 10:555–563
16. Erickson V. J., Adams W. T. (1989), Mating success in a coastal Douglas-fir seed orchard as affected by distance and floral phenology. *Can. J. For. Res.*, 19, 1248–1255
17. Eriksson G., Ekberg I., David C. (2007), *An introduction to forest genetics*. Uppsala: Department of plant biology and forest genetics, 186 s. ISBN 91-576-7190-7
18. Fowler D. P. (1965), Natural self-fertilization in three jack pines and its implications in seed orchard management. *Forest Science*, 11(1), 55-58
19. Frankel O. H., Brown A. H. D., Burdon, J. J. (1995), *The Conservation of Plant Biodiversity*; Cambridge University: Cambridge, UK
20. Frankham R., Ballou J. D., Briscoe D. A. (2002), *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge: Cambridge University Press
21. Funda T., Lstibůrek M., Lachout P., Klápště J., El-Kassaby Y. A. (2009), Optimization of 226 combined genetic gain and diversity for collection and deployment of seed orchard 227 crops. *Tree Genet Genomes* 5:583-593 228
22. Funda T., El-Kassaby Y. A. (2012), Review: Seed orchards genetics. *CAB Rev.*7, 13. [CrossRef] 5. Bell, G.D.; Fletcher, A.M. Computer organised orchard layouts (COOL) based on the permuted neighbourhood design concept. *Silvae Genet.* 1978, 27, 223–225
23. Funda T., El-Kassaby Y. A. (2013), Seed orchard genetics. *Plant Sci Rev* 2012:21-43 229
24. Giertych M. (1975), Seed orchard designs. *For. Comm. Bull*, 54, 25–37
25. Griffin A. R., Lindgren D. (1985), Effect of inbreeding on production of filled seed in *Pinus radiata* experimental results and a model of gene action. *Theor. Appl. Genet*, 71, 334–343
26. Haapanen M. (2007), *Synchronising tree breeding and seed orchard programs in Finland*. Umea: Summary reports on papers and posters presented at the seed orchard conference, 18 s
27. Hagqvist R. (1992), *Production of genetically improved birch seed and micropropagated seedlings*. Metsänjalostussäätiö 1991. Helsinki, Finland: Metsänjalostussäätiö (Foundation for Forest Tree Breeding)

28. Harju A., Muona O. (1989), Background pollination in *Pinus sylvestris* seed orchards. *Scandinavian Journal of Forest Research* 4:513-20
29. Hayda Y., Los S., Yatsyk R., Tereshchenko L., Shlonchak G., Mytrochenko I. N., Samodai, V., Smashnyuk L., Klisz M., Mohytych V. (2019), Seed orchards in Ukraine: past, present and prospects for the future. *Folia Forestalia Polonica*, 61(4), 284-298
30. Hodge, Gary R. a Timotky L., White. (1993) Advanced generation wind-pollinated seed orchard design. *New forests*, roč. 7, 213–236 s
31. Chaloupková K. (2016), Návrh schématu výsadby semenných sadů na bázi panmiktického modelu, diplomová práce, Česká zemědělská univerzita v Praze
32. Chaloupková K., Stejskal J., El-Kassaby Y. A., Lstibůrek M. (2016), Optimum neighborhood seed 216 orchard design. *Tree Genet Genomes* 12:105 217
33. Chaloupková K., Stejskal J., El-Kassaby Y. A., Frampton J., Lstibůrek M. (2019), Current advances 214 in seed orchard layouts: two case studies in conifers. *Forests* 10:1-6 215
34. Charkravarty G. N., Bagchi S. K. (1993), A computer program for permuted neighbourhood seed orchard design, *Silvae genetica* 42, 1–5 s
35. Charkravarty G. N., Bagchi S. K. (1994), Enhancement of the computer program of the permuted neighborhood seed orchard design. *Silvae Genet*, 43, 177–179
36. Chen X., Sun X., Dong L., Zhang S. (2018), Mating patterns and pollen dispersal in a Japanese larch (*Larix kaempferi*) clonal seed orchard: a case study. *Science China Life Sciences*. 61. 1-13. 10.1007/s11427-018-9305-7
37. Kaňák J., Frýdl J., Novotný P., Čáp J. (2008), Metodika zakládání semenných sadů. Strnady: Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, Lesnický průvodce 9, 26 s, ISBN 978-80-7417-007-2
38. Kaňák J. (2011), Návrh šlechtitelských postupů pro borovici lesní v západních a jižních Čechách. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, disertační práce, 148 s
39. Kang K. S. (2001), Genetic gain and gene diversity of seed orchard crops. Umeå: Swedish university of agricultural sciences, 2001, ISBN 91-576-6071-9
40. Kang K. S., Lindgren D. (2001), Fertility variation and its effect on the relatedness of seeds of *Pinus densiflora*, *Pinus thunbergii* and *Pinus koraiensis* clonal seed orchards. *Silvae genet.* 47(4), 1998, 196-201 s
41. Kang K. S., Park Y. H., Han S. U., Kim C. S. (2003), Gain and diversity resulted from genetic thinning in a clonal seed orchard of *Pinus koraiensis* S. et Z. In *Proceedings of*

- the Korean Society of Crop Science Conference (pp. 36-36). The Korean Society of Crop Science
42. Kang K. S., El-Kassaby Y. A., Han S. U., Kim C. S. (2005), Genetic gain and diversity under different thinning scenarios in a breeding seed orchard of *Quercus acutissima*. *Forest ecology and management*, 212(1-3), 405-410
  43. Klápště J. (2008), Návrh šlechtitelského programu pro posázavský smrk. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, Disertační práce
  44. Kobliha J., Funda T. (2004), Šlechtitelské programy smrku ztepilého v ČR a EU. Svoboda nad Úpou: Smrk - dřevina budoucnosti: sborník příspěvků, 39 - 46s
  45. Kobliha J., Lstibůrek M., Hynek V., Klápště V., Stejskal J. (2012), Metodika testů potomstev lesních dřevin pro zakládání semenných sadů 2. generace. Ministerstvo zemědělství ČR, 2012a
  46. Kotrla P., Pařízek M. (2009), Zakládání semenných sadů z pohledu legislativy. *Lesnická práce* 8/09, roč. 88
  47. Kowalczyk J., Lindgren D. (2012), Seedling seed orchards in Poland. Antalya: Seed orchards and breeding theory conference. Sborník příspěvků. 124 s
  48. La Batide J. G. A. (1967), A computer program for the layouts of seed orchards. *Euphytica* 16, 1967, 321-323 s
  49. Liesebach H., Liepe K., Bäucker C. (2021), Towards new seed orchard designs in Germany – a 232 review. *Silvae Genet*
  50. Lindgren D., Matheson A. C. (1986), An algorithm for increasing the genetic quality of seed from 234 seed orchards by using the better clones in higher proportions. *Silvae Genet* 35:173-177 235
  51. Lindgren D. (2006), *LINEAR\_DEPLOYMENT-2006.XLS.*, dostupné na [http://daglindgren.upsc.se/Breed\\_Home\\_Page/](http://daglindgren.upsc.se/Breed_Home_Page/); software
  52. Lstibůrek, M., Mullin, T. J., Mackay, T. F. C., Huber, D., & Li, B. (2005). Positive assortative mating with family size as a function of predicted parental breeding values. *Genetics*, 171(3), 1311-1320
  53. Lstibůrek M., El-Kassaby Y. A. (2010), Minimum-inbreeding seed orchard design. *For Sci* 241 56:603–608 242
  54. Lstibůrek M., El-Kassaby Y. A. (2010), Minimum-inbreeding seed orchard design. *For. Sci.* 56, 603–608

55. Lstibůrek M., Ivanková K., Kadlec J., Kobliha J., Klápště J., El-Kassaby Y. A. (2011), Breeding without breeding: Minimum fingerprinting effort with respect to the effective population size. *Tree Genet. Genomes* 7, 1069–1078
56. Lstibůrek M., Klápště J., Kobliha J., El-Kassaby Y. A. (2012), Breeding without breeding: Effect of gene flow on fingerprinting effort. *Tree Genet. Genomes* 8, 873–877
57. Lstibůrek M., Hodge G. R., Lachout P., (2015), Uncovering genetic information from commercial forest plantations. Making up for lost time using “breeding without breeding”. *Tree Genet. Genomes* 11, 55
58. Lstibůrek M., Stejskal J., Misevicius A., Korecký J., El-Kassaby Y. A. (2015), Expansion of the minimum-inbreeding seed orchard design to operational scale. *Tree Genet. Genomes* 11, 12
59. Mckeand S. a Weir R. A. R. (2000), Impact of forest genetics on sustainable forestry - results from two cycles of loblolly pine breeding in the US. *Journal of sustainable forestry*, č. 10, 79–85 s
60. McKeand S., a Beineke F. (1980). Sublining for half-sib breeding populations of forest trees. *Silvae Genet* 29(1): 14-17
61. Meuwissen T. H. (1997), Maximizing the response of selection with a predefined rate of 243 inbreeding. *Journal Anim Sci* 75:934-940
62. Mitton, J. B. (1992), The dynamic mating systems of conifers. *New Forest*, 6, 197–216
63. Murat A., Ozturk H, Siklar S. (2007), Seed orchard planning and management in Turkey, Umea: Summary reports on papers and posters presented at the seed orchard conference, 18 s
64. Musil J. (2003), *Lesnická dendrologie 1*. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, ISBN 80-213-0992-x-2. ed
65. Musil J., Novák, P., Šefl J. (2007), Semenné sady v České republice. In: Sarvaš, M. Sušková, M. (edit.): *Aktuální problémy lesného školkářstva, semenárstva a umelej obnovy lesa*, Liptovský Ján: Sborník referátov z mezinárodného seminára, 27-28 s, ISBN 978-80-8093-013-4
66. Namkoong G., Kang H. C., Brouard J. S. (1988), Provenance testing, ecogeographic surveys, and conservation. In *Tree Breeding: Principles and Strategies*; Springer: New York, NY, USA, pp. 132–159
67. Nason J. D., Herre E. A., Hamrick J. L. (1996), Paternity analysis of the breeding structure of strangler fig populations: evidence of substantial long-distance wasp dispersal. *Journal of biogeography* 23, 1996, 501-512 s

68. Nester M. R. (1994), Modulo tile constructions for systematic seed orchard designs. *Silvae Genet* 43:312–320
69. Nikkanen T. (2001), Reproductive phenology in a Norway spruce seed orchard. *Silva Fenn.*, 35, 39–53
70. O'Connell L. M. (2003), The Evolution of Inbreeding in Western Redcedar (*Thuja plicata*: Cupressaceae). Ph.D. Thesis, The University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada
71. Pakkanen A., Nikkanen T., Pulkkinen, P. (2000), Annual variation in pollen contamination and outcrossing in a *Picea abies* seed orchard. *Scan. J. For. Res.*, 15, 399–404
72. Pařízek M. (2014), Zakládání semenných sadů. Krytokořenný sadební materiál: sborník příspěvků. Otradovice, 55-61 s
73. Paule L. (1992), Genetika a šľachtenie lesných drevín. Bratislava: Príroda a. s., 305 s. ISBN 80-07-00409-2
74. Petersen J. L., Ueckert D. N. (2005), Fourwing saltbush seed yield and quality: Irrigation, fertilization, and ecotype effects. *Rangeland ecology & management*, 58(3), 299-307
75. Poupon, V., Chakraborty, D., Stejskal, J., Konrad, H., Schueler, S., & Lstibůrek, M. (2021). Accelerating Adaptation of Forest Trees to Climate Change Using Individual Tree Response Functions. *Frontiers in Plant Science* 12.
76. Poykko S. (2008), Finnish birch seed production 1970-2007. In: Lindgren, D. (ed.) *Proceedings of the Seed Orchard Conference, Umea, Sweden, 26-28 September 2007*
77. Prescher F., Lindgren D., Almqvist C., Kroon, J. Lestander, T. A., Mullin, T. J. (2007), Female fertility variation in mature *Pinus sylvestris* clonal seed orchards. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 22(4), 280-289
78. Prescher F., Lindgren D., Karlsson B. (2008), Genetic thinning of clonal seed orchards using linear 223 deployment may improve both gain and diversity. *Forest Ecology and Management*
79. Prescher F., Lindgren D., Karlsson B. (2008), Genetic thinning of clonal seed orchards using linear deployment may improve both gain and diversity, *Forest Ecology and Management*, Volume 254, Issue 2, Pages 188-192, ISSN 0378-1127,
80. Rambousek J. (2003), Semenné sady lesních dřevin v České republice. *Lesnická práce* 01/03, 2003, roč. 82

81. Saarsalmi A., Savonen E. M., Nikkanen T., Lipas E., Mikola J. (1994), Effect of fertilization on flowering and seed crop in Scots pine seed orchards
82. Shimono A., Wang X. R., Torimaru T., Lindgren D., Karlsson, B. (2011), Spatial variation in local pollen flow and mating success in a *Picea abies* clone archive and their implications for a novel “breeding without breeding” strategy. *Tree genetics & genomes*, 7(3), 499-509
83. Slavov G. T., Howe G. T., Adams W. T. (2005), Pollen contamination and mating patterns in a Douglas-fir seed orchard as measured by simple sequence repeat markers. *Can. J. For. Res.* 35, 1592–1603
84. Stacy E. A., Hamrick J. L., Nason J. D., Hubbel S. P., Foster R. B. R. (1996), Condit. Pollen dispersal in low-density populations of three neotropical tree species. *American naturalist* 148, 275-298 s
85. Torimaru T., Wang X.R., Fries A., Anderson B., Lindgren D. (2009), Evaluation of pollen contamination in an advanced Scots pine seed orchard. *Silvae Genet.* 2009, 58, 262–269
86. Torimaru T., Wennestrom U., Andersson B., Almqvist C., Wang X. R. (2013), Reduction of pollen contamination in Scots pine seed orchard crop by tent isolation. *Scandinavian Journal of Forest Research*. roč. 28, č. 8, 715–723 s
87. Vancalay J. K. (1991), Seed orchard designs by computer. Australia: Department of forestry, *Silvae genetica* 40: 89-91 s. 1991
88. Varghese M., Lindgren D., Ravi N. (2006), Linear thinning in a clonal test of *Eucalyptus camaldulensis* for conversion to a clonal seed orchard *J. Tropical Forest Sci.*, 18, pp. 51-5
89. Webber J. E. (1995), Pollen management for intensive seed orchard production. *Tree Physiology* 15: 507-514
90. Wennstrom U., Bergstein U., Nilsson J. E. (2007), Seedling establishment and growth after direct seedling with *Pinus sylvestris*: effects of seed type, seed origin, and seedling year, *Silvae Fenn.* 41, 299-314 s
91. White T. L., Adams T. W., Neale D. B. (2007), *Forest genetics*. USA and UK: CABI publishing, 682 s. ISBN 978-0-85199-083-5
92. White T. L., Adams W. T., Neale D. B. (2007), Deployment—Open pollinated varieties full-sib families and clones. In *Forest Genetics*; CABI publishing: Wallingford Oxfordshire, UK; pp. 439–478



93. Williams C. G., Savolainen O. (1996), Inbreeding depression in conifers: Implications for breeding strategy. *For. Sci.*, 42, 102–117
94. Wilson S. (2015), Pollen Contamination and Pollination Management in Tree Seed Orchards; Report of a Literature Survey for the Future Trees Trust
95. Woods J. H., Heaman J. C. (2019), Effect of different inbreeding levels on filled seed production in Douglas-fir. *Can. J. For. Res.* 1989, 19, 54–59. [CrossRef] *Forests*, 10, 93  
6 of 6
96. Wu H. X. (2018), Benefits and risk of using clones in forestry—A review. *Scan. J. For. Res.*, 33
97. Xie C. Y., Woods J., Stoehr M. (1994), Effects of seed orchard inputs on estimating effective population size of seedlots – a computer simulation. *Silvae Genetica* 43: 145–154 s
98. Yamada Y., Yokouchi K., Nishida A. (1975), Selection index when genetic gains of individual 247 traits are of primary concern. *Japanese J Genet* 50:33-4
99. Zas A. R., Merlo E., Fernández L. J. (2003), SYNCHRO: A SAS program for analysing the floral phenological synchronisation in seed orchards. *Silvae Genet.*, 52, 212–215
100. Zavadil Z. (1982), Semenné plantáže lesních dřevin. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1982, 141 s
101. Zobel B. J., Barber J., Brown C. L., Perry T. O. (1958), Seed orchards—Their concept and management. *J. Forest.*, 56, 815–825
102. Zobel B., Talbert J. (1984), Applied forest tree improvement. USA: North Carolina State univerzity, 1984, 505 s. ISBN - 10: 1-930665-81-4, ISBN - 13: 978-1-1930665-81-1

## **9. Přílohy**

1. Kód pro tvorbu schémat pomocí ONA , část „Orchard“.
2. Kód pro tvorbu schémat pomocí ONA, část „Input“.
3. Kód, část Kód pro tvorbu schémat pomocí ONA, část „Evaluation“.
4. Kód pro tvorbu schémat pomocí ONA, část „Neighbours“.
5. Kód pro tvorbu schémat pomocí ONA, část „Data“.
6. Kód pro tvorbu schémat pomocí ONA, část „Output“.
7. Kód pro ONA genetickou probírku, část „Orchard“.
8. Kód pro ONA genetickou probírku, část „Neighbours“.
9. Kód pro ONA genetickou probírku, část „Input“.
10. Kód pro ONA genetickou probírku, část „Selection“.

## 1. Kód pro tvorbu schémat pomocí ONA , část „Orchard“.

```

orchard.R x Input.R x Evaluation.R x Neighbours.R x Data.R x Output.R x
Source on Save
1 rm(list=ls())
2 start.time <- sys.time()
3
4 #library(compiler)
5 #enableJIT(3)
6 library(gdata)
7 |
8 source("Input.R")
9
10 write("Min theoretical variance..", file = "bestorchard.txt", varmin, append = FALSE, "\n")
11 write("*", file = "bestorchard.txt", append = TRUE, sep = " ")
12 write("*", file = "bestpairs.txt", append = FALSE, sep = " ")
13 write("*", file = "varmin.txt", append = FALSE, sep = " ")
14
15 for (iter in 1:NITER) {
16 cat("iter = ", iter, "\n")
17 penalty <- 0
18
19 source("Data.R")
20
21 if(choice == 0) { # systematická vyplňování
22 for (i in 1:rows) {
23 for (j in 1:columns) {
24 if(orchard[i,j] == 0) {
25 source("Evaluation.R") # vyplňování pozice nejlepšího kandidátem
26 }
27 }
28 }
29 }
30
31 else { # náhodná vyplňování
32
33 # 1. najít vlechna volná místa ve schématu
34 x <- array(c(0:0),dim=empty)
35 y <- array(c(0:0),dim=empty)
36 count <- 0 # počet tabule prázdných míst
37 for (i in 1:rows) {
38 for (j in 1:columns) {
39 if(orchard[i,j] == 0) {
40 count <- count + 1
41 x[count] <- i # a zapsat x pozice do vektoru
42 y[count] <- j # a zapsat y pozice do vektoru
43 }
44 }
45 }
46
47 # 2. znáhodnit zjištěná volná místa
48 rx <- array(c(0:0),dim=empty)
49 ry <- array(c(0:0),dim=empty)
50 r <- sample(c(1:count), count) # náhodná lžada výběr
51 for(i in 1:count) { # znáhodňování lžad a sloupců
52 rx[i] <- x[r[i]]
53 ry[i] <- y[r[i]]
54 }
55
56 # 3. náhodná vyplňování
57 for(t in 1:count) { # znáhodňování lžad a sloupců
58 i <- rx[t] # x-souřadnice náhodné pozice
59 j <- ry[t] # y-souřadnice náhodné pozice
60 source("Evaluation.R") # vyplňování pozice nejlepšího kandidátem
61 }
62 }
63
64 if(printchoice < 1) {
65 source("Output.R")
66 }
67
68 if(min < totalmin) {
69 totalmin <- min
70 bestorchard <- orchard
71 print(bestorchard)
72 bestpairs <- pairs
73 cat(".....", "\n")
74 cat("criterion = ", min, "\n")
75 cat("variance:", var(upperTriangle(bestpairs, diag=FALSE))*((size-1)/size), "\n")
76 if(printchoice == 1) {
77 source("Output.R")
78 }
79 }
80 gc()
81 }
82
83 cat("xxx BEST SOLUTION xxx", "\n")
84 cat("Min theoretical variance..", varmin, "\n")
85 cat("Best variance:", var(upperTriangle(bestpairs, diag=FALSE))*((size-1)/size), "\n")
86 end.time <- Sys.time()
87 time.taken <- end.time - start.time
88 cat("Computing time:", time.taken, "\n")
89 cat("Computing time/iteration:", time.taken/NITER, "\n")

```

## 2. Kód pro tvorbu schémat pomocí ONA, část „Input“.

```
orchard.R * Input.R * Evaluation.R * Neighbours.R * Data.R * Output.R *
Source on Save
1 # vstup zadávaná uřivitelem
2 NITER <- 100 # poãet nezãvislãch iteracã
3 weight <- 100 # vãha plãilãzenã separaci ramet stejnãho klonu (0 = nulovã vãha)
4 set.seed(12345) # seed pro generãtor nãhodnãch ããã
5 choice <- 0 # systematickã vyplãovãnã = 0, nãhodnã vyplãovãnã = 1
6 printchoice <- 0 # 1 tiskne vãsledky nejlepããch lããenã, 0 tiskne vããchny vãsledky (do souborã)
7
8 # deklarace ostatnãch promãnnãch
9 totalmin <- 999999999999
10 |
```

### 3. Kód pro tvorbu schémat pomocí ONA, část „Evaluation“.

```
orchard.R x Input.R x Evaluation.R x Neighbours.R x Data.R x Output.R x
Source on Save
1 NC <- (sum(trees > 0)) # number of trees not allocated
2
3 # sample randomly trees that are not allocated and store them in a vector
4 if(NC > 1) {
5   candidates <- sample(trees[trees > 0], NC)
6 } else {
7   candidates <- max(trees)
8 }
9
10 # now evaluate each candidate (one at a time)
11 min <- 9999999999
12 for (k in 1:NC) {
13   orchard[i,j] <- candidates[k]
14   source("Neighbours.R") # we evaluate the candidate with direct neighbours
15   if(criterion < min) { # we store data on the best solution so far
16     min <- criterion
17     best.tree <- candidates[k]
18   }
19 }
20
21 # and pick the best tree
22 l <- 1
23 best <- 0
24
25 while(best == 0){
26   if(trees[l] == best.tree) {
27     trees[l] <- 0
28     orchard[i,j] <- best.tree
29     best <- 1
30   }
31   l <- l + 1
32 }
```

#### 4. Kód pro tvorbu schémat pomocí ONA, část „Neighbours“.

```
orchard.R x Input.R x Evaluation.R x Neighbours.R x Data.R x Output.R x
Source on Save
1 # loop through the whole matrix and sum all pair-wise matches
2 pairs <- array(0:0, dim = c(NT,NT))
3 penalty <- 0
4
5 for (r in 1:rows) {
6   for (c in 1:columns) {
7     left = 0; right = 0; up = 0; down = 0
8
9     center <- orchard[r,c]
10
11     if(c != 1) left <- orchard[r,c-1]
12     if(left == center) penalty = penalty + 1
13
14     if(c != columns) right <- orchard[r,c+1]
15     if(right == center) penalty = penalty + 1
16
17     if(r != 1) up <- orchard[r-1,c]
18     if(up == center) penalty = penalty + 1
19
20     if(r != rows) down <- orchard[r+1,c]
21     if(down == center) penalty = penalty + 1
22
23     if(left != 0) {
24       pairs[center,left] <- pairs[center,left] + 1
25     }
26
27     if(right != 0) {
28       pairs[center,right] <- pairs[center,right] + 1
29     }
30
31     if(up != 0) {
32       pairs[center,up] <- pairs[center,up] + 1
33     }
34
35     if(down != 0) {
36       pairs[center,down] <- pairs[center,down] + 1
37     }
38   }
39 }
40
41 # remove reciprocals from the diagonal
42 diagonal <- diag(pairs)
43
44 for (z in 1:NT){
45   if(diagonal[z] > 0) {
46     diagonal[z] <- diagonal[z]/2
47   }
48 }
49 diag(pairs) <- diagonal
50
51 penalty <- penalty/2
52 size <- (NT*NT-NT)/2 # size of the upper triangular matrix
53
54 #criterion <- var(pairs), p[enA`sobujeme korekcA`, proto[le poAftA`me rozptyl pro celou populaci, nikoliv sample
55 criterion <- var(upperTriangle(pairs, diag=FALSE))*((size-1)/size) + penalty*weight
56
57 # criterion <- 1 # this value would provide random schemes, unmark this and hide everything else
```

## 5. Kód pro tvorbu schémat pomocí ONA, část „Data“.

```
orchard.R x Input.R x Evaluation.R x Neighbours.R x Data.R x Output.R x
Source on Save
1 #vektor trees obsahuje seznam všech klonů a ramet, které se mají rozmístit do následného schématu
2
3 #trees <- array(c(1,1,1,1,2,2,2,2,3,3,3,3,4,4,4,4), dim = 16)
4
5 trees <- array(c(1,1,1,1,1,1,2,2,2,2,3,3,3,3,4,4), dim = 16) # konkrétní ramety, která slovaná vzestupně dle klonů,
6 #
7 clonalSize <- c(3,2,2,2) # počty ramet dle klonů, nutno zadat
8
9 # clonalSize <- c(4,4,4,4)
10
11 # x- strana mlet
12 x <- 4 # nutno zadat
13 # y- strana mlet
14 y <- 4 # nutno zadat
15
16 psm <- x*(y-1)+y*(x-1) # počet sousedství na mlet
17
18 # matice orchard obsahuje seznam všech pozic v následném schématu
19 #orchard <- array(0:0, dim = c(x,y))
20
21 #orchard <- data.matrix(data, rownames.force = NA)
22 orchard <- matrix(c(0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0), nrow=4, ncol=4, byrow = TRUE)
23
24 #počet klonů vstupujících do evaluace (včetně těch z MI schématu), musí být slovaná od 1 do NT!
25 NT <- max(trees)+0 # v případě předchozího MI schématu: nutno přidat další slova
26
27 rows <- nrow(orchard)
28 columns <- ncol(orchard)
29 empty <- length(which(orchard != 0)) # počet prázdných pozic v zadaném schématu
30
31 # vypočet minimálního rozptylu
32 res.comb <- combn(clonalSize, 2)
33 soucin <- sum(res.comb[1,]*res.comb[2,])
34 v <- (res.comb[1,]*res.comb[2,])/soucin
35 v <- v*psm
36 varmin <- var(v)*((length(v)-1)/length(v))
```

## 6. Kód pro tvorbu schémat pomocí ONA, část „Output“:

```
orchard.R x Input.R x Evaluation.R x Neighbours.R x Data.R x Output.R x
Source on Save
1 write(iter, file = "bestorchard.txt", append = TRUE, sep = " ")
2 write(var(upperTriangle(bestpairs, diag=FALSE))*((size-1)/size), file = "bestorchard.txt", append = TRUE, sep = " ")
3 write.table(bestorchard,file="bestorchard.txt", append = TRUE,col.names=F,row.names=F)
4 write(iter, file = "bestpairs.txt", append = TRUE, sep = " ")
5 write.table(bestpairs,file="bestpairs.txt", append = TRUE,col.names=F,row.names=F)
6
7 write(min, file = "varmin.txt", append = TRUE, sep = " ")
8
```



## 7. Kód pro ONA genetickou probírku, část „Orchard“.

```
orchard.R | Neighbours.R | Input.R | Selection.R
1 rm(list=ls())
2 start.time <- Sys.time()
3 library(gdata)
4 #layout("OMA layout")
5
6 my_mode <- function(x) { # Mode function
7   unique_x <- unique(x)
8   tabulate_x <- tabulate(match(x, unique_x))
9   unique_x[tabulate_x == max(tabulate_x)]
10 }
11
12 for (iter in 1:10){
13
14   source("Input.R")
15   NT <- max(trees)
16   rows <- nrow(orchard)
17   columns <- ncol(orchard)
18   write(" ", file = "neorchard.txt", append = TRUE, sep = " ")
19   pairs <- array(0:0, dim = c(NT,NT))
20   NC <- (sum(removal > 0)) # pocet jedince k odstraneni
21
22 for (i in 1:NC) { # postupne odstranime NC jedincu ze schematu
23   m <- my_mode(removal) # nalezni nejpočetnější klon nebo vyber nahodny ze seznamu
24   candidate <- if(length(m) > 1) sample(my_mode(removal),1) else my_mode(removal)
25   pairs <- pairs*0
26   # source("Neighbours.R")
27   # nalezni jakyk klonem je "candidate" v nejčetnější kombinaci
28   # prohledaj kombinace po radce matice "pairs"
29   if(candidate < NT) colsp = candidate-1 else colsp = candidate
30   if(candidate > 1) rowsp = candidate-1 else rowsp = candidate
31
32   ca = pairs[candidate,colsp:ncol(pairs)]
33   clr <- max(ca) # najdi nejvetší hodnotu napravo od diagonaly
34   c2r <- match(clr,ca) + candidate # najdi pozici této největší hodnoty (sloupec matice pair)
35
36   # prohledaj kombinace po sloupci matice "pairs"
37   ca = pairs[1:rowsp,candidate]
38   clic <- max(ca) # najdi nejvetší hodnotu napravo od diagonaly
39   c2c <- match(clic,ca) # najdi pozici této největší hodnoty (radka matice pair)
40
41   # vyber nejvetší hodnotu z obou moznosti
42   if(c1r > clic){
43     cv <- clr
44     cy <- c2r # id klonu
45   } else {
46     cv <- clic
47     cy <- c2c # id klonu
48   }
49
50   # nmi name dvojici ("candidate" a "cy"), pro kterou hledame spolecny vyskyt
51   source("Selection.R") # vystupem je pozice "row.scol", z ktere odstranime "candidate"
52   orchard[srow,scol] <- 0 # odstranit kandidata z pozice v sadu
53   pos <- match(candidate,removal) # pozice candidate ve vektoru removal
54   removal <- removal[-pos] # odstranit candidate z vektoru removal
55 }
56
57 pairs <- pairs*0
58 source("Neighbours.R") # spoctej finalni matici pairs
59 write.table(orchard,file="best_GT_orchard_plasy_R020.txt", append = TRUE,col.names=f,row.names=f)
60 gc()
61
62 write.table(pairs,file="best_GT_pairs_plasy_R020.txt", append = TRUE,col.names=f,row.names=f)
63 gc()
64
65 write(haha, file="variance_plasy_R020.txt", append = TRUE)
66
67 }
68
69 end.time <- Sys.time()
70 time.taken <- end.time - start.time
71 cat("Computing time:", time.taken, "\n")
72
73
74 # rotate <- function(x) t(apply(x, 2, rev))
75 #
76 # image(rotate(orchard))
```

## 8. Kód pro ONA genetickou probírku, část „Neighbours“.

```
orchard.R x Neighbours.R x Input.R x Selection.R x
1 # loop through the whole matrix and sum all pair-wise matches
2 penalty <- 0
3
4 for (r in 1:rows) {
5   for (c in 1:columns) {
6     left = 0; right = 0; up = 0; down = 0
7     leftup = 0; rightup = 0; leftdown = 0; rightdown = 0;
8
9     center <- orchard[r,c]
10
11     if(c != 1) {left <- orchard[r,c-1]
12       if(r != 1) leftup <- orchard[r-1,c-1]
13       if(r != rows) leftdown <- orchard[r+1,c-1]
14     }
15     if(left == center) penalty = penalty + 1
16     if(leftup == center) penalty = penalty + 1
17     if(leftdown == center) penalty = penalty + 1
18
19     if(c == columns) {right <- orchard[r,c+1]
20       if(r != 1) rightup <- orchard[r-1,c+1]
21       if(r != rows) rightdown <- orchard[r+1,c+1]
22     }
23     if(right == center) penalty = penalty + 1
24     if(rightup == center) penalty = penalty + 1
25     if(rightdown == center) penalty = penalty + 1
26
27     if(r != 1) up <- orchard[r-1,c]
28     if(up == center) penalty = penalty + 1
29
30     if(r == rows) down <- orchard[r+1,c]
31     if(down == center) penalty = penalty + 1
32
33     if(leftup != 0) {
34       pairs[center,leftup] <- pairs[center,leftup] + 1
35     }
36
37     if(rightup != 0) {
38       pairs[center,rightup] <- pairs[center,rightup] + 1
39     }
40
41     if(leftdown != 0) {
42       pairs[center,leftdown] <- pairs[center,leftdown] + 1
43     }
44
45     if(rightdown != 0) {
46       pairs[center,rightdown] <- pairs[center,rightdown] + 1
47     }
48
49     if(left != 0) {
50       pairs[center,left] <- pairs[center,left] + 1
51     }
52
53     if(right != 0) {
54       pairs[center,right] <- pairs[center,right] + 1
55     }
56
57     if(up != 0) {
58       pairs[center,up] <- pairs[center,up] + 1
59     }
60
61     if(down != 0) {
62       pairs[center,down] <- pairs[center,down] + 1
63     }
64   }
65 }
66
67 # remove reciprocals from the diagonal
68 diagonal <- diag(pairs)
69
70 for (z in 1:NT){
71   if(diagonal[z] > 0) {
72     diagonal[z] <- diagonal[z]/2
73   }
74 }
75 diag(pairs) <- diagonal
76
77 penalty <- penalty/2
78 size <- (NT*NT-NT)/2 # size of the upper triangular matrix
79
80 #criterion <- var(pairs); p1="enÅ"subjeme korekcÅ, protoÅe poÅtÅtÅ"me rozptyl pro celou populaci, nikoliv sample
81 criterion <- var(upperTriangle(pairs, diag=FALSE))*((size-1)/size) + penalty*weight
82
83
84 haha <- var(upperTriangle(pairs, diag=FALSE))*((size-1)/size)
85
86
87
88
89 # criterion <- 1 # this value would provide random schemes, unmark this and hide everything else
1329 (Top Level) z
```

## 9. Kód pro ONA genetickou probírku, část „Input“.

```
orchard.R x Input.R x Neighbours.R x Selection.R x
# general input
1 weight <- 100 # weight to separate ramets of the same clone (0 = no weight)
2 set.seed(12345) # random seed number
3 printchoice <- 1 # 1 print out the best solution, 0 print out all solutions (to a file)
4
5
6 # orchard <- matrix(c(5,2,3,4,5,
7 #                   3,4,5,1,2,
8 #                   5,1,2,3,4,
9 #                   2,3,4,5,1,
10 #                   4,5,1,4,0), nrow=5, ncol=5, byrow = TRUE)
11
12 rm(list=ls())
13 library("readxl")
14 my_data <- read_excel("Plasy_RAND.xlsx", range = "51A1:BF21", col_names = FALSE)
15 orchard <- as.matrix(my_data)
16
17 # orchard <- read.table(file = "vstup.txt",
18 #                      sep = "", header=FALSE)
19
20
21 # seznam klonu a ramet zastoupenych ve stavajicim sadu
22 # trees <- array(c(1,1,1,1,
23 #                2,2,2,2,
24 #                3,3,3,3,
25 #                4,4,4,4,4,4,
26 #                5,5,5,5,5,5), dim =24 )
27
28 # seznam klonu a ramet, k probirce
29 removal <- array(c(1,1))
```

## 10. Kód pro ONA genetickou probírku, část „Selection“.

```
orchard.R | Input.R | D | Neighbours.R | Selection.R
# Source on Save
1 # name dvojici ("candidate" a "y"), pro kterou hledame spolecny vyskyt
2 # v pririme sousedstvi v matici orchard
3
4 # Find distances between row and column indexes
5 w <- which(orchard==orchard, arr.ind=TRUE)
6 d <- as.matrix(dist(w, "maximum", diag=TRUE, upper=TRUE))
7
8 # extract neighbouring values for each element
9 # extract where max distance is one
10 a <- apply(d, 1, Function(x) orchard[x == 1])
11 names(a) <- orchard
12
13 # convert to a matrix, where row is the position going down and right
14 # and columns are neighbours
15 z.mat <- t(apply(a, length(a), max(lengths(a))))
16 pozice <- rep(0, length(orchard)) # pozice kandidata
17
18 # cycle through the orchard
19 count = 0
20 zcol = ncol(z.mat)
21 for (c in 1:columns) {
22   for (r in 1:rows) {
23     count = count + 1
24     val1 = orchard[r,c]
25     if((val1 == candidate)&(orchard[r,c]==0)) {
26       for (v in 1:zcol) {
27         if(!TRUE(z.mat[count,v] == cy)) {
28           pozice[count] <- 1
29         }
30       }
31     }
32   }
33 }
34
35 # hodnota "1" ve vektoru "pozice" znaci, ze na tento pozici je pritom "candidate"
36 # v pririme sousedstvi s jedincem "y"
37 # na techto pozicich budu prislusnou rametu postupne odstranovat a zjisovat co to
38 # udele s kriterialemi funkcii
39
40 crts <- rep(9999999, length(orchard))
41 count = 0
42 for (c0 in 1:columns) {
43   for (r0 in 1:rows) {
44     count = count + 1
45     if(orchard[r0,c0]==0) {
46       if(pozice[count]==1) {
47         mem <- orchard[r0,c0]
48         orchard[r0,c0] <- 0
49         pairs <- pairs 0
50         source("Neighbours.R") # find the value of criterion
51         crts[count] <- criterion # record the criterion
52         orchard[r0,c0] <- mem # return candidate to the position
53       }
54     }
55   }
56 }
57
58 # select the best solution (lowest criterion)
59 minc <- min(crts) # Find the minimum
60 pinc <- match(minc, crts) # Find the location of the minimum
61
62 srow = 0
63 scol = 0
64 count <- 0
65 # find the location of the best solution in the orchard
66 for (c in 1:columns) {
67   for (r in 1:rows) {
68     count = count + 1
69     if(count == pinc) {
70       srow <- r
71       scol <- c
72     }
73   }
74 }
75
76 (Top level)
```