

**Lesy České republiky, s.p., Hradec Králové**

**VÝZKUMNÉ PROJEKTY  
GRANTOVÉ SLUŽBY LČR**



***Projekt***

**Ucelený metodický postup ověřování deklarovaného původu  
sadebního materiálu pomocí genetických markerů**

Závěrečná zpráva

***Řešitel***

**Česká zemědělská univerzita v Praze  
Fakulta lesnická a dřevařská**



Odpovědný řešitel:

**Ing. Jiří Korecký, Ph.D.**

Spoluřešitelé:

Prof. Ing. Milan Lstibůrek, MSc. PhD., Ing. Jan Stejskal, Ph.D., Ing. Zuzana Bínová, Mgr. Jan Bílý, Ph.D., RNDr. Jaroslav Čepl, Ph.D., Bc. Kryštof Vacek, Ing. Jakub Dvořák, Ing. Dagmar Zádrapová, Ing. Filip Pastierovič

***Praha, 2018***

**Závěrečná zpráva řešení projektu** je syntézou výsledků celého výzkumného projektu.

**Poznámka:**

- Znak pro velikostní předponu **mikro  $\mu$**  je v celém textu nahrazen znakem **u**, a to z důvodu nesprávného zobrazení tohoto specifického znaku v některých verzích textového editoru Microsoft Word.
- Ve všech případech je fluorescenčně naznačen forward primer.
- *Verze závěrečné zprávy (ke zveřejnění) nemusí mít posloupný charakter číslování kapitol, obrázků a grafů.*

## Anotace projektu

Metodika ověřování deklarovaného původu sadebního materiálu je principiálně založena na přístupu porovnávání (komparace). Posuzuje se genetická informace filiální generace, tj. směsný vzorek jedinců (sazenic či případně přímo osiva), u kterých je požadavek na ověření deklarované příslušnosti. Posuzuje se původ zjištěné genetické informace k deklarované rodičovské populaci. Jinými slovy, dochází k rekonstrukci rodokmene (určení příbuzenských vazeb potomek – rodič).

K rekonstrukci rodokmene se využívá vhodný počítačový algoritmus a posuzuje se hypotéza, že posuzovaní jedinci jsou potomky deklarované rodičovské populace. Pokud lze rekonstrukci příbuzenských vazeb považovat za úspěšnou, je deklarovaný původ potvrzen. Pokud při komparativní analýze nedojde k identifikaci vazeb rodič – potomek, je původ k deklarované zdrojové populaci vyloučen. Pro každou ze zájmových dřevin byly optimalizovány dva multiplexy, které umožňují provést časově i ekonomicky efektivní genotypizaci na 18 až 26 mikrosatelitových (SSRs) lokusech. Metodiku lze využít také v případě potřeby ověření klonové identity při vegetativní propagaci reprodukčního materiálu, například v semenných sadech, klonových výsadbách či u embryogenních linií propagovaných *in vitro*. Při ověřování klonové příslušnosti dochází k porovnávání genetických profilů (alel) u zájmových jedinců a posuzuje se shoda či odlišnost genotypu. V případě ověřování deklarovaného původu reprodukčního materiálu, který vznikl generativní cestou, jsou vstupními parametry pro rekonstrukci rodokmene genotypy potomků a genotypy deklarované rodičovské populace.

Pro analýzu genetické informace reprodukčního materiálu je odebírán směsný vzorek – doporučuje se analyzovat 100 jednotek reprodukčního materiálu. Způsob výběru jedinců by se měl opírat o metody náhodného výběru, tj. technicky provedeného tak, aby každá jednotka měla statisticky stejnou a nezávislou možnost stát se součástí výběru. Při vzorkování sazenic na záhonech se doporučuje postupovat v analogii s normou ČSN 48 2118 Inventarizace sadebního materiálu lesních dřevin ve školkách. Při odběru náhodného vzorku osiva je před odběrem nezbytné zajistit jeho dokonalé promísení.

Navržená metoda analýzy je aplikovatelná na všechny typy zdrojů reprodukčního materiálu. Z praktického pohledu je racionální soustředit se především na superiorní zdroje reprodukčního materiálu. Vytvořený kontrolní nástroj má význam především pro ověření, zda v produkčním řetězci zůstává zachován a zpět do lesních porostů se vrací geneticky kvalitní a tedy žádoucí materiál.

Součástí řešení projektu je také ekonomická rozvaha využití metodiky včetně posouzení finanční náročnosti různých přístupů k analýze genetické informace a vypracování posudku a také prognóza cenového vývoje genetických analýz do budoucna. Pro iterativní úpravu nákladových položek v ekonomické analýze je vytvořen soubor výpočetních vzorců v Excelu a je k dispozici jako jeden z dílčích výstupů projektu.

## A. Přehled dílčích kroků řešení projektu

1. Lokalizace a zaměření jedinců zájmových populací, odběr vzorků v testovacích populacích pro 4 zájmové dřeviny, zpracování vzorků pro izolaci DNA.
2. Izolace DNA ze vzorků všech zájmových dřevin, ověření vhodnosti izolačních kitů.
3. Výběr potenciálně vhodných mikrosatelitových primerů na základě rozboru vědeckých pramenů, ověřování amplifikace na polyakrylamidových gelech na jedincích testovací populace, následné fluorescenční značení vybraných primerových párů.
4. Sestavení genotypizačního protokolu z fluorescenčně značených primerů sdružených do multiplexů.
5. Analýza genetické struktury testovacích populací zájmových dřevin
6. Principy posouzení deklarované příslušnosti reprodukčního materiálu
7. Analýza potřeby ověřování původu sadebního materiálu v lesnickém provozu včetně návrhu přístupu v závislosti na různých scénářích (typ zdroje reprodukčního materiálu, cíl analýzy apod.).
8. Ekonomická rozvaha využívání metodiky včetně finanční analýzy předpokládaného snižování finanční náročnosti

## B. Ověřování původu sadebního materiálu pro zájmové dřeviny

Kapitoly 1.1. Odběr materiálu k izolaci, 1.2. Izolace DNA, 1.3. Výběr a optimalizace mikrosatelitových markerů a 1.4. Optimalizace multiplexů a fragmentační analýza popisují obecně platné postupy společné pro všechny zájmové dřeviny, přičemž na případná specifika platná pro konkrétní dřevinu či skupiny dřevin je v textu poukázáno.

Následující kapitoly 2. Buk lesní, 3. Dub zimní, 4. Jedle bělokorá, 5. Smrk ztepilý popisují postup optimalizace a finální soubory primerových sekvencí (multiplexy) druhově specifických mikrosatelitových primerů.

Kapitola 6 řeší Návrh využití vytvořeného genotypizačního nástroje a kapitola 7 je ukázkou Vyhodnocení dat a stanovení hraničních hodnot pro posouzení deklarovaného původu sadebního materiálu.

# 1. Obecné zásady při ověřování původu sadebního materiálu

## 1.1. Odběr materiálu k izolaci DNA

Odebírané vzorky by neměly vykazovat poškození a napadení hmyzem či houbami. Rostlinnou část pro odběr volíme podle snadnosti a rychlosti odběru, fyziologického stavu vzorku či míry poškození vzorku při odběru. Je preferován odběr asimilačních – ontogeneticky nejmladších – rostlinných pletiv (pupenů, listů, jehličí) závislý na dostupnosti na daném jedinci. Při odběru asimilačních orgánů zvolíme, zda budeme sbírat pupeny či listy. Pokud je to možné, preferují se pupeny – jednak odstranění krycích šupin před zpracováním vzorků zvyšuje čistotu odebraného materiálu a také jde o materiál, který na jednotku hmoty obsahuje velké množství DNA.

V případě nemožnosti odběru asimilačních pletiv (dospělý strom s vysoko nasazenou korunou, využití stromolezců je možné, ale značně by navýšilo náklady) se přistupuje k odběru kambia. Odebraný materiál musí reprezentovat genotyp zájmového jedince, je nutno se vyhnout pletivům s odlišnou genetickou informací (tj. semena, plody). Odběr materiálu může probíhat celoročně, s přihlédnutím k aktuální dostupnosti konkrétního typu pletiva.

### 1.1.1. Odběr asimilačních orgánů

Při odběru asimilačních orgánů je rozhodujícím faktorem výška nasazené koruny. Pro účely molekulárně-genetické analýzy je potřeba odebrat materiál s nejmladšími buňkami, ideálně pupeny či mladé jehlice. V případě stromů, které mají vysoce nasazenou korunu, je vhodné využít teleskopické nůžky, případně jiný prostředek umožňující odběr vzorků (žebřík, lezecká souprava). Listy společně s pupeny je z jednotlivých stromů nejlepší odebírat ve formě nejmladších prýtů či celé větvičky. Pro eliminaci nutnosti opětovného odebírání v případě neúspěšné izolace DNA je vhodné odebírat cca 20 pupenů, 10 listů či zhruba dva zhruba 5 cm dlouhé letorosty s jehlicemi.

### 1.1.2. Odběr kambia

Kambium je odebráno z jednotlivých stromů za pomoci ocelového průbojníku, např. o průměru 14 mm (obr. 1).



Obrázek 1 Ocelový průbojník (průměr 14 mm)

Pro účely genetických analýz je potřeba odebírat materiál s nejmladšími buňkami. Zájmový je materiál nejmladších vrstev dřeva – tedy kambialní vrstva a přilehlé nejmladší vrstvy xylému a floému (obr. 2). Průbojník (obr. 1) se přiloží do úrovně prsní výšky (lepší okulární kontrola odběru) kolmo ke kmeni a následně se zatluče po úroveň vnějších vrstev dřeva. Tento postup zajistí odběr nejvhodnějšího materiálu – velmi tenké kambialní vrstvy. Následně je vzorek z průbojníku vytlačen přímo do uzavíratelného plastového sáčku. Z jednoho jedince je vhodné odebrat dva výseky (druhý slouží jako záložní pro potřeby opakované izolace DNA). Alternativou (v případě požadavku na co nejméně viditelný odběr) je provést výsek na patě kmene.





Obrázek 2 Výsek odebrané vrstvy s kambiem

Místo odběru vzorku je velmi vhodné ihned ošetřit stromovým balzámem. Takto ošetřená ranka není rizikovým místem pro vnik infekce či patogenu (obr. 3).



Obrázek 3 Stav stromu po prvním roce od odběru vzorku

V závislosti na konkrétním účelu lze strom také fyzicky označit, např. sprejem či identifikační destičkou (obr. 4). Do budoucna lze také předpokládat možnost využívat identifikační štítky, které umožní snadné dohledání jedince v porostu.



Obrázek 4 Označení stromu při odběru kambia

### 1.1.3. Identifikace vzorku a možnosti uchování

Po odebrání vzorku je vhodné jej uzavřít do zipového uzavíratelného igelitového sáčku vhodné velikosti. Pro možnost opakování izolace DNA bez nutnosti opětovného odběru je žádoucí odebrat dostatečné množství materiálu. Spolu s odebraným materiálem se do sáčku umisťují kuličky silikagelu, a to 2-3 vrchovaté kávové lžičky (silikagel pro laboratorní účely, výrobce např. Sigma-Aldrich). Silikagel je sorbent jímající vlhkost. Silikagel může být po důkladném vysušení používán opakovaně. Ihned je nutno provést jednoznačnou identifikaci vzorku (nesmazatelný fix, či vložení štítku do sáčku, obr. 5) s číslem stromu a lokalitou, aby nedošlo k záměně. V případě izolace DNA je možno takto upravené vzorky převést do laboratoře při běžných teplotách s vyloučením teplotních extrémů (např. v rozpáleném automobilu), kde se ihned zpracují nebo uloží při nízké teplotě k pozdějšímu zpracování. Pro krátkodobé uchování vzorků (v řádu hodin či 1-2 dnů) postačuje uskladnění v lednici, pro střednědobé uchování (v řádu dní a týdnů) je vhodné vzorky skladovat v běžném mrazáku, pro dlouhodobé uchování vzorků (týdny až měsíce) jsou vhodné hluboko mrazicí boxy (teplota cca – 75 °C).

Alternativou pro transport a uchování vzorků je uskladnění v tekutém dusíku. Jde však o technicky náročnější a nákladnější způsob, který je obhajitelný pouze v odůvodněných případech. Například při odběru vzorku pro analýzu RNA, která velmi rychle podléhá degradačním procesům. DNA je považována za relativně stabilní a dočasně je možno vzorky uchovávat i při pokojové teplotě.



Obrázek 5 Skladované vzorky odebraného kambia



Obrázek 6 Skladování odebraného asimilačního aparátu

Při skladování je důležité vést jednoznačnou a nezaměnitelnou evidenci, vzorky mít řádně uzavřeny v pytlících, aby nedošlo k jejich záměně (obr. 6).

## 1.2. Izolace DNA

Prvním krokem pro zjištění genetické informace je uvolnění DNA z buněk a její oddělení od ostatních buněčných složek. Cílem izolace je získání DNA v nativním stavu a v dostatečném množství a kvalitě. Nejprve je provedeno mechanické rozbití rostlinných pletiv. Vzorek je nejprve vychlazen v tekutém dusíku a následně rozmělněn buď tloučkem ve zkumavce, a nebo rozdrčen v oscilačním mlýnu. Při izolaci dochází také k odstranění inhibitorů, jež blokují činnost enzymů v následných analýzách. Mnohdy je výhodnější získat DNA vyšší kvality než vyšší koncentrace (ŠMARDKA ET AL., 2005; CLARK, 2013). Izolaci DNA je nejlepší provádět z čerstvého biologického materiálu případně z čerstvě lyofilizovaného (CHASE & HILLS 1991). Tento proces zabraňuje degradaci nukleových kyselin enzymy přítomnými v buněčném extraktu.

### 1.2.1. Využití izolačních kitů

Dnes jsou komerčně dostupné tzv. izolační kity, které obsahují předpřipravené roztoky a jsou dodávány společně s pracovním protokolem. Umožňují rychlou a efektivní izolaci DNA bez nutnosti přípravy vlastních izolačních roztoků, obecně tedy kladou nižší nároky na odbornost a zkušenost laboranta. V minulosti byla nejrozšířenější metodou izolace DNA CTAB metoda (CLARK, 2013). Dnes se však od této metody ustupuje, právě kvůli již zmíněné větší náročnosti.

Izolace bývá prováděna dle protokolu, který je přiložen v příslušném izolačním kitu. Často jsou obecné návody upravovány dle konkrétního typu výchozího materiálu. Pro případ zájmových dřevin došlo k prodloužení doby lyze na 50 minut, což přineslo vyšší výtěžky DNA.

Součástí kitu jsou předpřipravené roztoky, specifický spotřební materiál (mikrofiltry). K některým roztokům je nutno před jejich použitím přidat etanol či izopropanol, dle doporučení výrobce kitu. Izolační soupravy využívají metodu založenou na principu purifikace DNA pomocí tzv. kolonek (mikrokolonek/filtrů). Při této metodě se v první fázi zachytí homogenizovaný materiál a větší nečistoty na první kolonce. Filtrát obsahuje DNA, RNA, proteiny, sacharidy, třísloviny a pigmenty, které se postupně budou odstraňovat. RNA se odstraní pomocí RNázy. Na křemičité částice ve struktuře druhého filtru se DNA naváže a poté dochází k tzv. promývání, kdy se z filtru odstraňují lipidy, sacharidy a zbytky etanolu. Závěrečným krokem je přidáním elučního pufu (nebo ultračisté vody) na kolonku. Po inkubaci

při teplotě 65°C a centrifugaci dojde k vymytí DNA z kolonky. Výsledným produktem je roztok DNA, jehož koncentrace a čistota je zjištěna spektrofotometrickým měřením.

Primárně byl pro izolaci nukleové kyseliny použit DNeasy Plant Mini Kit od výrobce QIAGEN. Tento kit je nejrozšířenějším pro vědecké a výzkumné studie (databáze vědeckých publikací na Web of Science). Byly však testovány také kity jiných výrobců, a to Invisorb Spin Plant Mini Kit (Stratag Biomedical AG), DNA Extraction Kit (Top-Bio) a Genomic DNA Mini Kit (Geneaid). V průběhu prací se kit QIAGEN projevil jako méně vhodný, jelikož neposkytoval stejný genotypizační profil pro materiál různého původu. Laboratorní souprava od firmy Geneaid se osvědčila jako nejlepší varianta z testovaných možností.

### **1.2.2. Zhodnocení izolačních kitů podle výsledků amplifikace**

Cílem použití dvou izolačních souprav bylo ověřit, zda obě soupravy poskytují konzistentní výsledky při aplikaci na různém rostlinném materiálu stejného druhu. Porovnáním výstupů sekvenátoru zobrazených pomocí softwaru GeneMarker (obr. 7) bylo zjištěno, že izolační soupravy Genomic DNA Mini Kit (Plant) značky GENE AID a DNeasy Plant Mini Kit značky QIAGEN poskytují v případě buku lesního, dubu zimního a jedle bělokoré konzistentní výsledky při izolaci z různých typů rostlinného materiálu (kambium x listy/pupeny, kambium x jehlice/pupeny). Lze tedy konstatovat, že izolační kit QIAGEN vykazuje odlišné amplifikační vrcholy mezi dvěma typy pletiv pouze u smrku ztepilého, a to pravděpodobně z důvodu přítomnosti druhově specifického inhibitoru.

### **1.2.3. Zhodnocení výtěžnosti DNA z pupenů a pletiva**

Pro potřeby čistoty a výtěžnosti vyizolované DNA bylo u každé zájmové dřeviny (buk lesní, dub zimní, jedle bělokorá a smrk ztepilý) provedeno porovnání a následné zhodnocení výtěžnosti z částí asimilačních orgánů. V případě jedle bělokoré a smrku ztepilého byla porovnávána čistota a výtěžnost z dřevních výseků a jehlic. U buku lesního a dubu zimního byla porovnávána výtěžnost a čistota DNA z listů či pupenů a dřevních výseků.

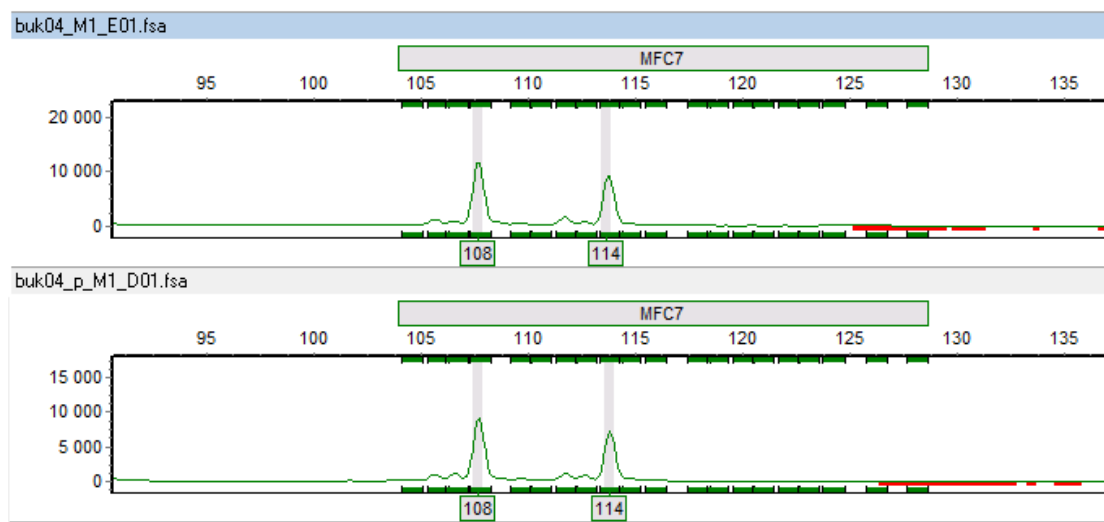
Duplicitně byla DNA izolována z 11 náhodně vybraných vzorků každé dřeviny. Izolací DNA z pupenů bylo obecně dosahováno výrazně vyšších koncentrací než izolací z dřevní hmoty a rozdíl koncentrací se často pohyboval v desítkách ng/μl, jak je patrné na příkladu buku

lesního (tabulka 1). Průměrná výtěžnost DNA u duplicitních vzorků byla z dělivého pletiva 19,66 ng/μl, průměrná výtěžnost z pupenů 154,75 ng/μl. Tato skutečnost je způsobena tím, že buňky v pupenu jsou výrazně menší než buňky dělivého pletiva, avšak množství genetické informace v obou typech buněk je stejné. Vzorky izolované z pupenů vykazovaly rovněž nepatrně vyšší hodnoty koeficientu 260/280.

Tabulka 1 Porovnání výtěžnosti DNA z kambia a pupenů

Vzorek	Dělivé pletivo [ng/μl]	koeficient 260/280	Pupen [ng/μl]	koeficient 260/280
1	72,6	1,84	189,3	1,89
2	63,4	1,83	158,2	1,89
3	28,3	1,72	196,9	1,87
4	10,9	1,42	145,5	1,84
5	13,3	1,7	57,4	1,78
6	7	1,49	104,3	1,85
7	6,5	1,59	149,8	1,89
8	10	1,81	231,7	1,9
9	27,2	1,85	280,1	1,91
10	20,9	1,86	160,9	1,91
11	28,8	1,91	217,4	1,87

I přes významné rozdíly v koncentraci DNA byly pro vzorky izolované z obou rostlinných materiálů získávány konzistentní výsledky ze sekvenátoru. Toto tvrzení dokládá výstup softwaru GeneMarker na obrázku 7, na kterém je zobrazen jeden lokus duplicitního vzorku, u kterého byla DNA izolována z dělivého pletiva (horní graf) i pupenu (spodní graf). Jedinec je na tomto lokusu heterozygotní s alelami 108 a 114 a peaky obou vzorků se shodují.

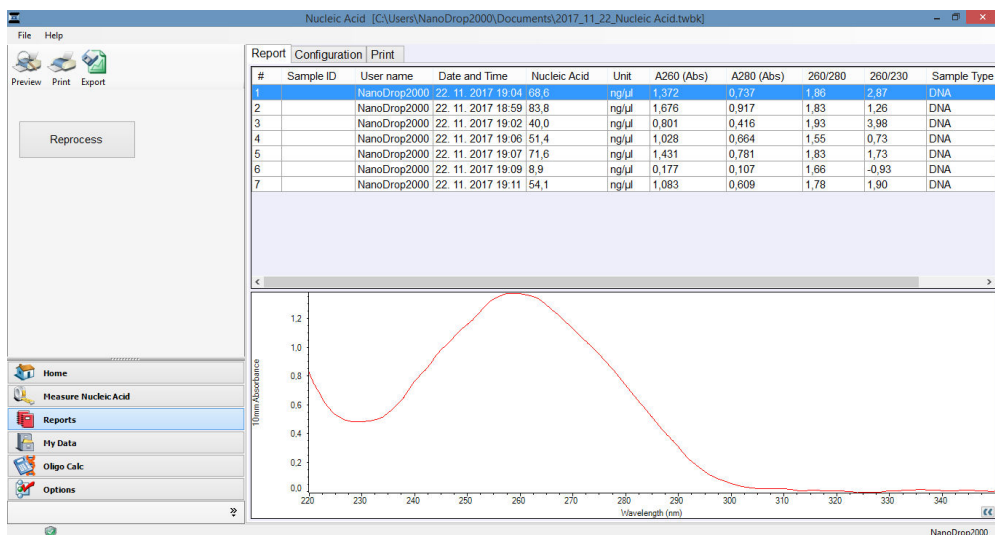


Obrázek 7 Výstupy ze sekvenátoru pro DNA izolovanou z kambia a pupenu

#### 1.2.4. Měření koncentrace DNA

Koncentrace izolované DNA se zjišťuje za pomoci spektrometrického přístroje. Při měření koncentrace byl využit přístroj a software NanoDrop. Pro přístroj je naprosto dostačující objem 1 ul roztoku k měření koncentrace a čistoty. Na začátku měření je nutno kalibrovat přístroj na použitý eluční roztok. Vzorek obsahující DNA generuje typickou křivku s vrcholem při vlnové délce 260 nm (obr. 8) a poměrový koeficient měřených vlnových délek 260/280nm by se měl pohybovat mezi hodnotami 1,7 - 1,9. Běžné hodnoty výtěžků se při cca 150 mg vstupního materiálu pohybují v rozmezí 15 – 100 ng/ ul roztoku DNA pro celkový eluční objem 100 ul.

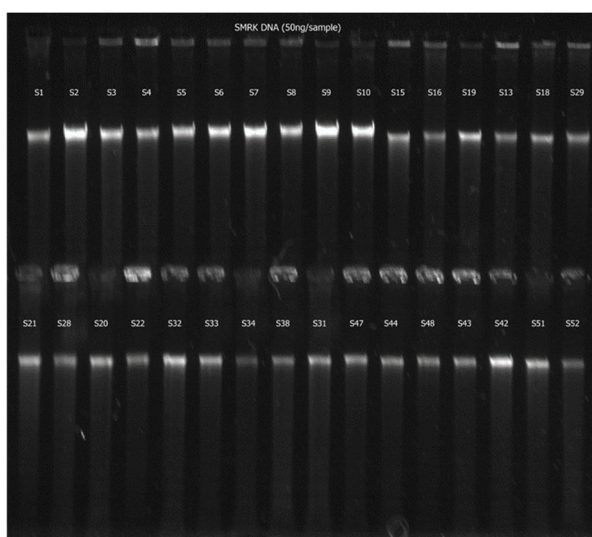




Obrázek 8 Typická absorbanční křivka pro čistou DNA

### 1.2.5. Kontrola kvality DNA na agarózovém gelu

Kvalita izolované DNA byla ověřována na 0,7% agarózovém gelu. Do jamky byl nanesen objem o celkovém množství 50 ng DNA.



Obrázek 9 Ověření kvality izolované DNA na agarózovém gelu

Na gelu (obr. 9) je patrné, že vzorky DNA nejsou degradovány a všechny mají srovnatelnou velikost. Různá intenzita proužků je zapříčiněna nepřesností ředění.

### **1.2.6. Standardizace koncentrace**

Koncentrace DNA se pohybovala v rozmezí zhruba od 10 do 100 ng/ul DNA. Z důvodu usnadnění pracovního postupu, je třeba všechny vzorky připravit tak, aby koncentrace DNA na 1 ul odpovídala 20 ng. Pro naředění vzorků o koncentraci vyšší než 20 ng/ul byla použita ultračistá voda jakožto ředící medium. Pro laboratorní potřeby byly vzorky připraveny na objem 20 ul. Hodnoty, které se pohybovaly pod hranicí 20 ng/ul, se ponechaly v původní koncentraci. Vzorky s hodnotou koncentrace nižší než 10 ng/ul byly zkoncentrovány evaporizérem.

### 1.3. Výběr mikrosatelitových markerů a ověřování amplifikace

#### 1.3.1. Způsob výběru markerů

V současnosti existuje značný počet navržených primerových párů potenciálně použitelných pro amplifikaci variabilních úseků (mikrosatelitů) pro vybrané dřeviny, není zde tedy opodstatnění pro snahu o časově a finančně nákladný vývoj nových oligonukleotidových sekvencí.

Při výběru mikrosatelitových primerů z dostupných zdrojů byly kritérii výběru vysoká míra polymorfismu, předpokládaný délkový rozsah amplikonu a kvalitativní vlastnosti lokusu.

Byl proveden důkladný rozbor publikovaných vědeckých článků a studií (Web of Science, Google Scholar) a databáze NCBI (National Center for Biotechnology Information) za účelem vyhledání souboru potenciálně vhodných mikrosatelitových primerů pro otestování amplifikace a míry polymorfismu. Zvýšená pozornost byla věnována výstupům řešícím analýzu genetické variability na mikrosatelitových lokusech v České republice (především kolektiv autorů VÚLHM). Markery využívané těmito výzkumníky nebyly opomenuty při testování primárního souboru primerů.

Synteticky připravené oligonukleotidy byly naředěny dle pokynů výrobce na 100 uM koncentraci. Pracovní roztoky používané v experimentech byly připraveny v koncentraci 10 uM. Roztoky primerů se skladují při teplotě -20°C uchované v zatmavených zkumavkách, aby nedocházelo k jejich degradaci a byla zajištěna dlouhá spotřební doba.

#### 1.3.2. PCR reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je třístupňový proces, který se opakuje v po sobě jdoucích cyklech. Díky termostabilní DNA polymeráze je namnožen úsek mezi dvěma oligonukleotidy (primery) na základě komplementarity bází se sekvencí templátové DNA. Při PCR reakci se jedná o směs obsahující templátovou DNA, termostabilní polymerázu, reakční roztok a primery. Tento proces je možný díky schopnosti DNA denaturovat a reasociovat v závislosti na různé teplotě.

### 1. Denaturace

Zahřátím DNA na teplotu kolem 95 °C se rozpadnou vodíkové můstky mezi vlákna templátové DNA, čímž se dvoušroubovicová DNA rozdělí na jednotlivá vlákna DNA a stává se tak receptivní pro komplementární mikrosatelitové primery.

### 2. Annealing (nasednutí primerů, hybridizace)

Druhá fáze je teplotně variabilní (45 – 60 °C), přičemž optimální teplota závisí na konkrétní nukleotidové sekvenci primerů. Dochází ke specifickému nasednutí primerů a tím vymezení oblasti amplifikace. Pokud jsou ve směsi v nadbytku specifické oligonukleotidy (*primery*), budou hybridizovat se svou komplementární sekvencí rychleji než dlouhé komplementární jednořetězcové molekuly, jejichž koncentrace je mnohem nižší. Teplota, při níž hybridizace probíhá, je pro výsledek PCR kritická a musí být vhodně zvolena. Při příliš nízké teplotě mohou primery nasedat i na sekvence, které jsou komplementární jen z části, a vytvoří se tak nespecifický produkt. Při vysoké teplotě zase budou primery hybridizovat minimálně a nevytvoří se dostatečné množství produktu.

### 3. Elongace

Syntéza nových řetězců probíhá při teplotě 65–75 °C v závislosti na typu použité DNA polymerázy. Primery, které dosedly na jednořetězcovou DNA (templát) v předchozím kroku, slouží v tomto kroku jako opora pro činnost polymerázy.

### 1.3.3. Složení testovací monoprimerové PCR směsi

Celkový objem PCR reakce 6 ul obsahoval 15 ng templátové DNA, forward a reverse primer o shodné finální koncentraci 250 nM, a 3 ul 2x koncentrovaného Type-it Multiplex PCR Master Mixu. Objem templátové DNA, mastermixu a primerů byl doplněn ultračistou vodou do celkového objemu. Pro pracovní koncentraci DNA 10 ng/ ul a primer 5 uM jsou reakční objemy uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2 Reakční objemy komponent PCR

Templátová DNA	1,5 ul
Primer I ( <i>Forward</i> )	0,3 ul
Primer II ( <i>Reverse</i> )	0,3 ul
Ultračistá H <sub>2</sub> O	0,9 ul
Type-it Multiplex PCR Master Mix	3,0 ul
<b>Celkový objem reakce</b>	<b>6,0 ul</b>

### 1.3.4. Použité způsoby elektroforetické separace

Pro testování amplifikace vybraných primerů byly použity dvě metody- polyakrylamidová gelová elektroforéza neboli vertikální elektroforéza a elektroforéza na agarozovém gelu, tzv. horizontální elektroforéza. V obou dvou případech se testovala tzv. nenaznačená verze primerů, tedy navržené primery bez fluorescenčních značek. Tyto metody posloužily k identifikaci amplifikace a přítomnosti polymorfismu.

#### *Gelová agarozová elektroforéza*

Gelová agarozová elektroforéza probíhá v médiu agarozového gelu. Tato metoda je oproti vertikální elektroforéze časově a technicky mnohem méně náročná. Jejím výsledkem ovšem bývá pouze zjištění, zda se mikrosatelitové primery amplifikují či neamplifikují. Oproti tomu vertikální polyakrylamidová elektroforéza, ač zdlouhavá, udává jasný výsledek, při kterém je patrný přítomný polymorfismus v ověřovaném souboru vzorků.

#### *Polyakrylamidová elektroforéza*

Nosičem u polyakrylamidové elektroforézy je polyakrylamidový gel. Elektroforetická souprava se skládá z dvou skel - krycího skla, které je vždy tenčí a spodního skla. Dále je

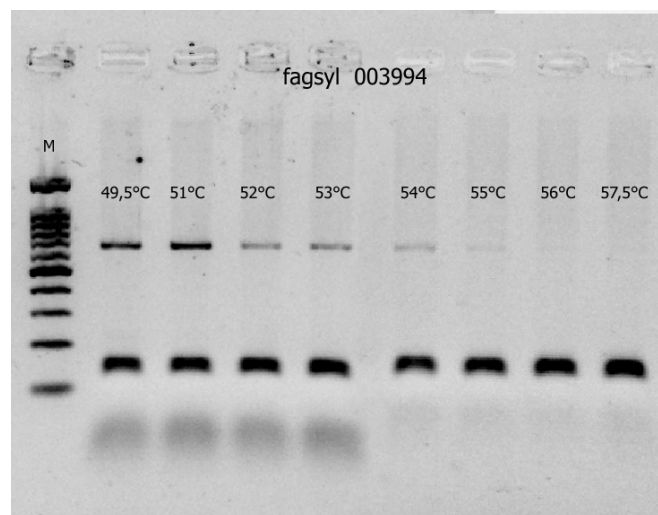
součástí elektroforézní soupravy vana s elektrodami, 2 podložky (*spacer*) o síle 0,25 mm, které udávají tloušťku gelu, elektrodové bočnice a spodní kryt, které drží skla pohromadě, plastový tvarovač na jamky (hřeben) a zdroj elektrického napětí.

### 1.3.5. Ověřování amplifikace pomocí elektroforézy

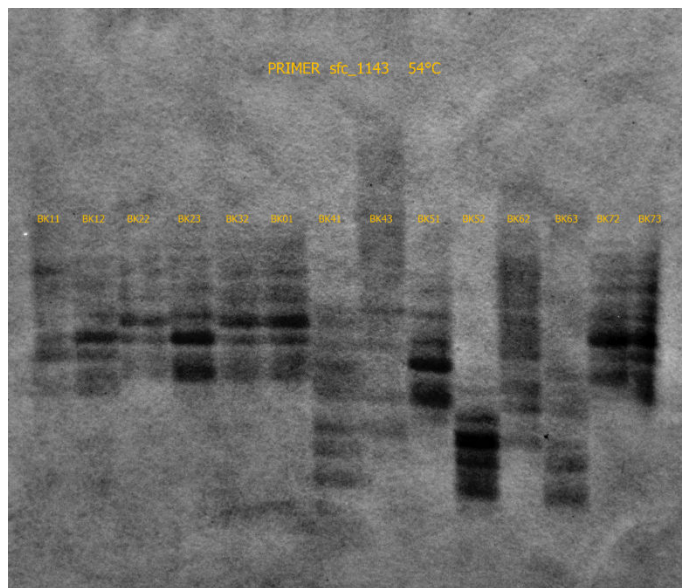
Pro jednotlivé primery a několik zkušebních vzorků DNA byla ověřena úroveň amplifikace při různých teplotách a následně byly amplifikující se primery rozděleny do čtyř skupin podle optimální teploty nasedání primeru. Výsledky těchto jednolokusových reakcí jsou podkladem pro vytvoření směsného reakčního roztoku - multiplexu.

U některých markerů byl polymorfismus viditelný již na agarózovém gelu (např. fagsyl 003994, obr. 10). Marker fagsyl 003994 vykazuje silnou amplifikaci (při teplotách 49,5°C a 51°C), u které však není možné rozeznat, zda se jedná o polymorfnní lokus či nikoliv. Pro detailnější zobrazení musela proto být u většiny markerů provedena polyakrylamidová vertikální elektroforéza (obr. 11).

Na základě výsledků o amplifikaci a polymorfismu byly vybrány ze souboru testovaných markerů ty, které byly následně naznačeny fluorescenční sondou a testovány v multiplexu.



Obrázek 10 Separace na agarózovém gelu pro primer fagsyl 003994



Obrázek 11 Detekce polymorfismu markeru sfc\_1143 na polyakrylamidovém gelu

## 1.4. Optimalizace multiplexů a fragmentační analýza

Multiplexem se rozumí sdružení většího počtu mikrosatelitových primerů do jedné polymerázové řetězové reakce. Aby mohlo být toto sdružení provedeno, musí být splněna určitá kritéria, a to především 1) odlišná délka amplifikovaných fragmentů značených stejnou fluorescenční barvou, 2) primerové páry netvoří v reakční směsi dimery, 3) podobné podmínky PCR reakce – především teplota annealingu. Poslední podmínka však v současné době není zásadním faktorem, jelikož existují optimalizované PCR reakční směsi (v tomto případě byl využit Type-it Microsatellite PCR kit, výrobce QIAGEN), ve kterých může být provedena amplifikace primerů vyžadujících odlišnou teplotu annealingu (nicméně v určitém rozmezí) při jedné konstantní teplotě. Multiplex je sestavován tak, aby se v ideálním případě použily všechny barvy značených fluorescenčních sond v maximálním délkovém rozsahu – červená (PET), zelená (VIC), modrá (FAM), žlutá (NED) a velikostní standard oranžová (LIZ). Výhodnost tvorby multiplexu spočívá především ve výrazném snížení finanční náročnosti a časové úspoře.

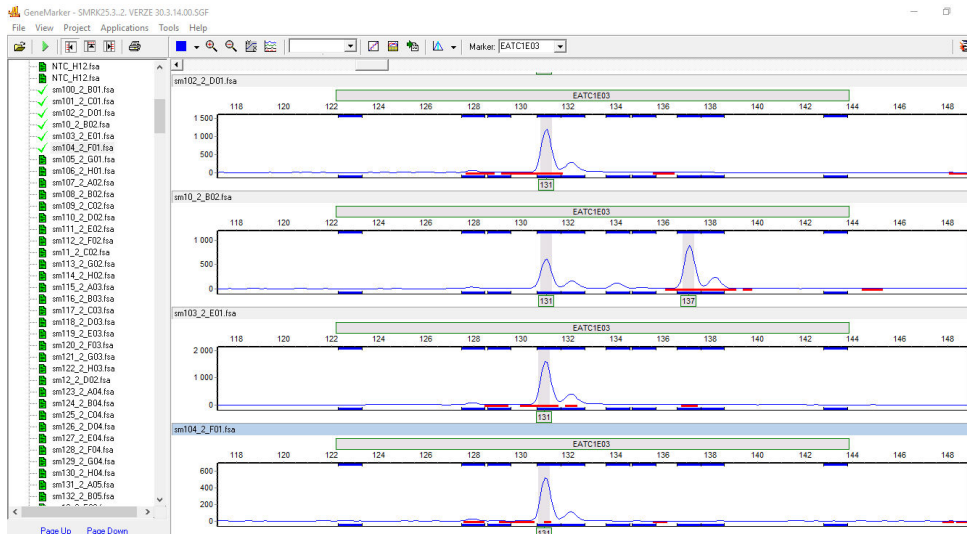
### 1.4.1. Optimalizace multiplexu

V této fázi se testuje schopnost amplifikace jednotlivých primerů při určité teplotě v jedné reakci. V této fázi se optimalizuje teplota a počet cyklů při PCR reakci.

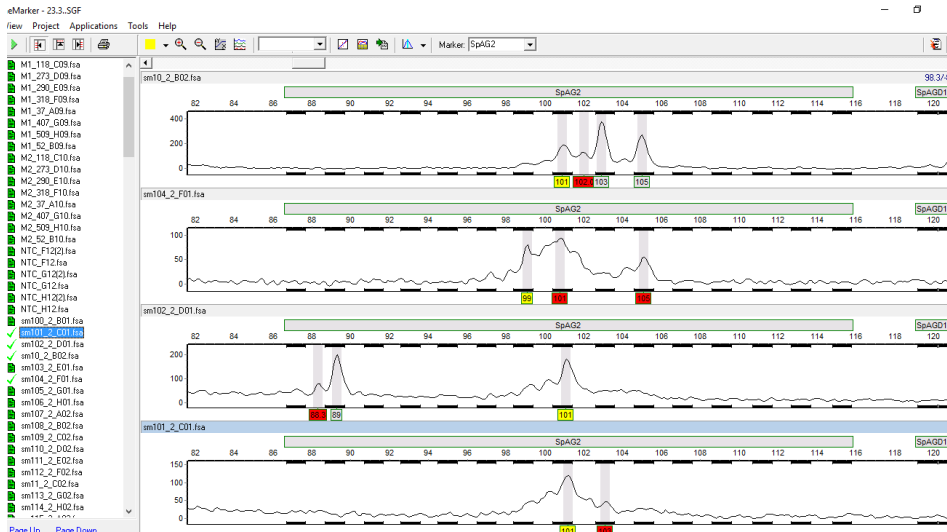
Byly testovány teploty 53°C, 55°C, 57°C a 60°C. Kromě teploty se testovala také vhodná koncentrace jednotlivých primerů. Koncentrace primerů musí být taková, aby na sekvenačním přístroji vykazovaly všechny primery na vybraných lokusech podobné koncentrace amplikonů.

Na obrázku 12 je zobrazen grafický výstup analýzy amplikonu jednoho lokusu (software GeneMarker). Z obrázku je patrné, že zkoumaný lokus má délkový rozsah v rozmezí 122-144 bp. Dalším důležitým kritériem je typický vzhled křivky vyobrazující alely na daném lokusu. Musí být ostrá a s jednoznačným lokálním vrcholem (běžně se používá z angličtiny převzatý výraz *peak* [pík]). Na obrázku 13 je pro ilustraci vyobrazen nespecificky se amplifikující produkt, který nelze jednoznačně vyhodnotit.





Obrázek 12 Ideální tvar detekovaných amplikonů



Obrázek 13 Nespecifický, těžko hodnotitelný produkt amplifikace

#### **1.4.2. Fragmentační separace na sekvenátoru**

Finálním krokem generování dat je fragmentační analýza na sekvenačním přístroji, při které dojde k separaci fluorescenčně značených amplikonů dle jejich délek. Na každý vzorek, zde již 1 ul PCR produktu, je třeba použít 12,2 ul formamidu a 0,5 ul standardu.

Pro zachování maximální kompatibility dat se doporučuje vyžadovat použití jednoho typu značeného velikostního standardu. Pro generování dat testovací populace byl použit standard GeneScan 500 LIZ. Délková separace byla prováděna na přístroji Applied Biosystems Genetic Analyzer 3500.

Výstupem sekvenační analýzy jsou soubory ve formátu fsa. Jde o standardní datový formát, který je zpracovatelný v příslušných počítačových programech, např. GeneMapper (Applied Biosystems), CEQ (Beckman Coulter) nebo GeneMarker (SoftGenetics LLC). Firma Applied Biosystems zdarma poskytuje jednoduchý prohlížeč na analýzu výsledků Peak Scanner, který analyzuje jednotlivé vzorky. Jeho omezením je, že neprovádí komplexní analýzy. SoftGenetics poskytuje demo verzi GeneMarker pro koncového uživatele na vyžádání. Ke generování dat testovací populace byl použit software GeneMarker. Výstupem je tabulka detekovaných alel (nejvhodněji export ve formátu Excel), které definují genotyp jedince na příslušných lokusech. Nejmenší rozdíl mezi dvěma alelami je dán velikostí jednotkové repetice příslušného mikrosatelitového úseku. Data jsou dále vyhodnocována pomocí vhodných softwarových nástrojů (viz kapitola Rekonstrukce rodokmene – určování rodičovství).

## 2. Buk lesní

### 2.1. Charakteristika buku lesního (*Fagus sylvatica* L.)

Buk lesní představuje jeden z nejrozšířenějších druhů listnatých stromů v Evropě, pokrývající okolo 12 milionů ha (LEFÈVRE ET AL., 2012). Vyznačuje se takřka kontinuálním areálem výskytu napříč evropským kontinentem (WÜHLISCH, 2008) a schopností růst v mnoha značně rozdílných environmentálních podmínkách – mediteránních až kontinentálních, na stanovištích rovinných až horských (NYÁRI, 2010). Tato environmentální diverzita se promítá také do genetické diverzity bukových porostů (COMPS ET AL., 1990).

Na území České republiky je buk lesní jediným zástupcem své čeledě a představuje zde rovněž nejvýznamnější druh listnatých dřevin (ÚRADNÍČEK, 2014). Přirozené zastoupení buku lesního činilo v minulosti asi 40 % všech dřevin. Vlivem lesnického hospodaření však bylo druhové složení našich lesů značně pozměněno oproti přirozené druhové skladbě. Zastoupení buku lesního značně kleslo zejména ve prospěch ekonomicky hodnotného smrku ztepilého (*Picea abies*), který byl lesnickým hospodařením na mnoha lokalitách upřednostňován. Buk lesní v současnosti tvoří přibližně 7,7 % dřevin (údaj z roku 2013). Do budoucna je očekáván opětovný vzrůst zastoupení listnatých dřevin, přičemž cílová hodnota zastoupení buku je 18 % (BALÁŠ ET KUNEŠ, 2014).

Tato dřevina je jednou z nejdůkladněji zkoumaných evropských druhů dřevin napříč vědeckými disciplínami. Rozsáhlý areál výskytu druhu a jeho velký ekonomický a ekologický význam staví buk do popředí zájmu nejen ekologie, paleoekologie či genetiky (JAZBEC ET AL., 2007; KRAJ ET SZTORC, 2009; MAGRI ET AL., 2006), ale činí z něj rovněž důležitý modelový druh při studiu odpovědi lesních ekosystémů na klimatické změny (GEßLER ET AL., 2007; JUMP ET AL., 2006A, 2006B; KRAMER ET AL., 2010; LEFÈVRE ET AL., 2012). Buk je vhodnou dřevinou z hlediska ochrany půdy, neboť produkuje velké množství listového opadu a má relativně mělké všestranné kořeny (PACKHAM ET AL., 2012; WÜHLISCH, 2008). Z těchto důvodů tak po dlouhém období, kdy byl lesníky upřednostňován smrk ztepilý (*Picea abies*), vzrůstá v posledních desetiletích snaha rozšiřovat porosty buku (DITTMAR ET AL., 2003; HASENKAMP ET AL., 2011; PAULE, 1982; RAJENDRA ET AL., 2014).

## 2.2. Genom buku lesního

Počet chromozomů v rámci rodu *Fagus* je velmi stabilní ( $2n = 24$ ). Přirozeně se vyskytující triploidní jedinci byli zaznamenáni pouze výjimečně. Porovnání chromozomů rodů *Fagus* a *Quercus* ukázalo, že jejich morfologie je velmi podobná. Obsah DNA je variabilní napříč čeledí *Fagaceae* – C hodnota pro *F. sylvatica* je 1,11 pg, resp. 535 Mbp. Velikost genomu je v porovnání s ostatními druhy z této čeledě malá. Zdá se, že rod *Fagus* má nejvíce redukovaný genom v této čeledi (KREMER ET AL., 2007).

Rozdíly v alelových frekvencích jsou do značné míry ovlivněny environmentálními podmínkami. Diverzita alel vzrůstá v oblastech, kde buk roste na stanovištích mimo své ekologické optimum – tzn. v suchém klimatu v jižních oblastech a ve studeném klimatu na horách a v severních oblastech. Směrem ke geografickému i ekologickému optimu diverzita alel klesá (DE LAFONTAINE ET AL., 2013; PACKHAM ET AL., 2012). Speciálním případem jsou populace buku na bývalých postglaciálních refugích, které z důvodu své malé velikosti a izolace vykazují poměrně nízkou úroveň interpopulační diverzity, zato vyšší intrapopulační diverzity v porovnání s jedinci na rekolonizovaných stanovištích (DE LAFONTAINE ET AL., 2013).

Na rozdíl od jiných rodů čeledě *Fagaceae*, genetické parametry rodu *Fagus* ještě nejsou důkladně prozkoumány. Vytvořením genetické mapy (tzv. *linkage map*) pro *F. sylvatica* se zabývají ve svých studiích SCALFI ET AL. (2004) či LESUR ET AL. (2015).

### 2.3. Vlastní výběr mikrosatelitových markerů

Na základě rozboru příslušné literatury bylo identifikováno cca 70 primerových párů, které byly v minulosti vyvinuty a použity pro výzkum mikrosatelitových lokusů buku lesního (tabulka 3). Z těchto primerů byl vyselektován užší výběr, který se na základě literatury osvědčil nejlépe, a tyto primery byly objednány bez fluorescenčního značení u firmy Geneti biotech. Při výběru primerů byly zohledňovány poznatky metodiky Studium variability populací buku lesního pomocí mikrosatelitových markerů (CVRČKOVÁ ET AL., 2016) vydané Výzkumným ústavem lesního hospodářství a myslivosti. U užšího výběru primerů byl testován jejich polymorfismus pomocí gelové elektroforézy s polyakrylamidovým separačním prostředím a dle tohoto kritéria bylo vybráno 21 primerů vykazujících vysoký podíl polymorfismu (ASUKA ET AL., 2004; LEFÈVRE ET AL., 2012; PASTORELLI ET AL., 2003; PLUETT ET MÄÄTTÄNEN, 2013; TANAKA ET AL., 1999). Kritériem výběru byla kromě míry polymorfismu také efektivita amplifikace. Bylo vybráno i několik primerů s nižší úrovní polymorfismu s cílem otestovat vzorky na co možná nejširším spektru lokusů.

### 2.4. Seznam testovaných mikrosatelitových markerů

Tabulka 3 Seznam testovaných markerů pro buk lesní

ID	Autor, rok	Název lokusu	ID	Autor, rok	Název lokusu
1	Troggio et al., 1996	<b>M809</b>	36	Asuka et al., 2004	<b>sfc0007-1</b>
2		<b>M814</b>	37		<b>sfc0007-2</b>
3		<b>M822</b>	38		<b>sfc0018</b>
4		<b>M842</b>	39		<b>sfc0036</b>
5		<b>M843</b>	40		<b>sfc0109</b>
6		<b>M845</b>	41		<b>sfc0146</b>
7		<b>M849</b>	42		<b>sfc0161</b>
8		<b>M850</b>	43		<b>sfc0195-2</b>
9		<b>M854</b>	44		<b>sfc0289-1</b>
10	Tanaka et al., 1999	<b>mfc2</b>	45		<b>sfc0305</b>
11		<b>mfc3</b>	46		<b>sfc360-2</b>
12		<b>mfc4</b>	47		<b>sfc0378</b>
13		<b>mfc5</b>	48		<b>sfc0488</b>
14		<b>mfc7</b>	49		<b>sfc1063</b>
15		<b>mfc9-2</b>	50		<b>sfc1105</b>
16		<b>mfc11</b>	51		<b>sfc1143</b>
17		<b>mfc12</b>	52	Lefevre et al., 2012	<b>DE576</b>

18		<b>mfc13</b>	53		<b>csolfagus31</b>
19	Vornam et al., 2004	<b>mfs11</b>	54		<b>csolfagus05</b>
20	Pastorelli et al., 2003	<b>FS1-15</b>	55		<b>solfagus06</b>
21		<b>FS1-25</b>	56		<b>csolfagus19</b>
22		<b>FS1-03</b>	57		<b>csolfagus29</b>
23		<b>FS1-11</b>	58		<b>EEU75-A-0</b>
24		<b>FS3-04</b>	59		<b>DUKCT-A-0</b>
25		<b>FS4-46</b>	60		<b>EJV8T-A-0</b>
26	Coutinho et al., 2014	<b>807</b>	61		<b>EMILY-A-0</b>
27		<b>810</b>	62		<b>ERHBI-A-0</b>
28		<b>817</b>	63		<b>DZ447-A-0</b>
29		<b>818</b>	64		<b>concat14-A-0</b>
30		<b>823</b>	65	Coutinho et al., 2014	<b>836</b>
31		<b>825</b>	66		<b>841</b>
32		<b>826</b>	67		<b>842</b>
33		<b>827</b>	68		<b>846</b>
34		<b>834</b>	69		<b>850</b>
35		<b>835</b>	70		<b>856</b>

Amplifikující se markery byly dále testovány a shlukovány do multiplexů. Multiplex musí splňovat kritéria odlišné délky amplifikovaných fragmentů naznačených stejnou fluorescenční barvou, primerové páry nesmí vytvářet v reakční směsi dimery a musí se shodovat podmínky PCR reakce, tedy především teplota annealingu. Výsledkem celého procesu je soubor 21 mikrosatelitových párů, které byly sdruženy do 2 multiplexů M1 a M2.

## 2.5. Vytvořené multiplexy M1 a M2 pro buk lesní

Tabulka 4 Protokoly buku lesního pro multiplexy M1 a M2

Multiplex 1		Délka (bp)	Objemy	Program	Reakce
1	concat14	170-197	0,3 ul	1x 95°C 5min	DNA 1 ul
2	EMILY	142-152	0,18 ul	95°C 45s	primery 5,16 ul
3	cscolfagus 31	103-130	0,225 ul	33x 60°C 60s	H <sub>2</sub> O 0,26 ul
4	mfc11	310-360	0,225 ul	72°C 60s	Type-It 6,42 ul
5	DE576	210-240	0,45 ul	1x 72°C 30min	
6	cscolfagus 05	167-180	0,18 ul	1x 4°C ∞	
7	FS1-03	90-140	0,12 ul		celkem 12,84 ul
8	mfc5	270-340	0,3 ul		
9	cscolfagus 19	150-185	0,12 ul		
10	cscolfagus 06	200-225	0,12 ul		
11	sfc0036	90-140	0,15 ul		
12	mfc7	110-104	0,15 ul		
13	ERHBI	159-167	0,06 ul		
			2,58 ul		
Multiplex 2		Délka (bp)	Objemy	Program	Reakce
1	EE75	90-115	0,15 ul	1x 95°C 5min	DNA 1 ul
2	Fagsyl 002929	152-210	0,15 ul	95°C 45s	primery 1,86 ul
3	Fagsyl 003849	98-128	0,105 ul	33x 60°C 60s	H <sub>2</sub> O 0,14 ul
4	DZ447	186-194	0,15 ul	72°C 60s	Type-It 3 ul
5	cscolfagus 29	130-150	0,09 ul	1x 72°C 30min	
6	Fagsyl 001018	107-130	0,105 ul	1x 4°C ∞	
7	DUKCT	75-95	0,09 ul		celkem 6 ul
8	Fagsyl 003093	150-205	0,09 ul		
			0,93 ul		

Pozn. Uvedený protokol je platný pro koncentraci DNA 20 ng/ul a koncentraci primerů 10mM

Tabulka 4 obsahuje jeden ze stěžejních výstupů řešení, a to sestavené a otestované multiplexy pro analýzu genetické struktury buku lesního.

Sestavené multiplexy byly testovány na vybraných populacích buku lesního na území České republiky. Multiplexy jsou konečným výsledkem testování výchozích 70 primerových párů.

První ze dvou multiplexů obsahuje 13 primerových párů, druhý čítá celkem 8 primerových párů, celkem je tedy generována informace o 21 mikrosatelitových lokusech. Oligonukleotidové sekvence vybraných primerů jsou uvedeny v tabulce 5.

Barevné označení u názvu lokusu odpovídá barvě fluorescenčního značení primeru (červená (PET), zelená (VIC), modrá (FAM), žlutá (NED)). Dále je uveden délkový rozsah ampliconů pozorovaný v testovací populaci, objem pracovní koncentrace primerů (je uveden objem pro jeden z primerového páru, objem druhého primeru je totožný), podmínky PCR a celkový objem reakce pro jeden vzorek.

Teplota annealingu pro oba multiplexy je 60°C při 33 cyklech polymerázové řetězové reakce.

Tabulka 5 Nukleotidové sekvence markerů začleněných do multiplexů – buk lesní

<b>Multiplex 1</b>					
<b>Autor</b>	<b>Lokus</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>	<b>Repetice</b>	<b>Bp</b>
Lefèvre et al., 2012	<b>CONCAT14</b>	TGAAGAAATTCACAACCCAACA	GGGTTGTTTACGATGGTGGA	TC	170-197
	<b>EMILY</b>	GACCCCAAGGTTACAGTGCT	CGTACAATTGCACCCACATC	GA	142-152
	<b>CSOLFAGUS_31</b>	TCTATTGACACAAGAATAAGAACACC	CTTGGCAAGAAAAGGGGATT	AG	103-130
	<b>DE576</b>	TCTCCTTAGATCCACAATCACA	AGCTCTTCATTGCTCAGAACG	CAA	210-240
	<b>CSOLFAGUS_05</b>	GGTTTCTAGCAAAAATTGGCATT	CCCAAAGGCCCTACTACAA	GA	167-180
	<b>CSOLFAGUS_19</b>	TGCCCATGAGGTTTGATCA	GCCGAATAACCCAGAAAACA	TC	150-185
	<b>CSOLFAGUS_06</b>	GTTGTTGCTCACAGCAGTCG	GTTGTTGCTCACAGCAGTCG	AG	200-225
	<b>ERHBI</b>	TGCAACAACCTTAGCACTTTGA	GCGTGTGGCTTATCCAAAAT	AG	159-167
Tanaka et al., 1999	<b>MFC11</b>	ACAGATAAAAAACAGAAGCCA	TTGGTTTTGTTGAGTTTAG	AG	310-360
	<b>MFC5</b>	ACTGGGACAAAAAACA	GAAGGACCAAGGCACATAAA	AG	270-340
	<b>MFC7</b>	AAAATACACTGCCCAAAA	CAGGTTTTGGTTTCTTACAC	GA	110-104
Pastorelli et al. 2003	<b>FS1_03</b>	CACAGCTTGACACATTCCAAC	TGGTAAAGCACTTTTCCCACT	GA	90-140
Asuka et al., 2004	<b>SFC0036</b>	CATGCTTGACTGACTGTAAGTTC	TCCAGGCCTAAAAACATTTATAG	TC	90-140
<b>Multiplex 2</b>					
<b>Autor</b>	<b>Lokus</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>	<b>Repetice</b>	<b>Bp</b>
Lefèvre et al., 2012	<b>EEU75</b>	TTCCAAACCAACCCTTTATCC	GACGGAGATTGAGGAAGAACA	CT	90-115
	<b>DZ447</b>	GGTGCAATACTTCACTTTAGGACA	ATAGGAGTGGGACGGCTAGG	TC	186-194
	<b>CSOLFAGUS_29</b>	CACAACCTGCATTCCCTTTC	GTTTGGCACTTTGGCTTGTT	CT	130-150
	<b>DUKCT</b>	GCCTCTCGCAGCTCCTATAA	GCCTCTCGCAGCTCCTATAA	AC	75-95
Pluess et Maattanen, 2013	<b>FAGSYL_002929</b>	GCGGCGACTGGAATAATAGC	CAATCACACGCTGCACAAAC	TTG	152-210
	<b>FAGSYL_003849</b>	GCTTCGTTCTTCGGCATCTC	AATAGCACAAATAGCCCGCC	CT	98-128
	<b>FAGSYL_001018</b>	AATATCAGGGAGGCAGCACC	CGAGATGGACTTCTAAGTTTATTTC	CT	107-130
	<b>FAGSYL_003093</b>	TCATCACCGAGACAAGGGAC	ATGGTGGTGTGGAAGCTAGG	CA	150-205



## 2.6. Genetická struktura testovací populace buku lesního

Základní soubor testovací populace tvoří 10 jedinců z deseti lokalit. Celkem se jedná o soubor čítající 100 jedinců buku lesního. Tabulka 69 nacházející se v přílohách obsahuje číselné značení jedinců, číslo přírodní lesní oblasti, název lesní správy a upřesňující název lokality pro snadnější identifikaci místa odběru. Počet sto jedinců je pro genetickou analýzu generalizující oblast celé České republiky statisticky nedostatečný. Testovací populace však byla analyzována především za účelem demonstrace diskriminační síly vytvořeného markeru, nikoliv jako rigorózní studie genetické diverzity.

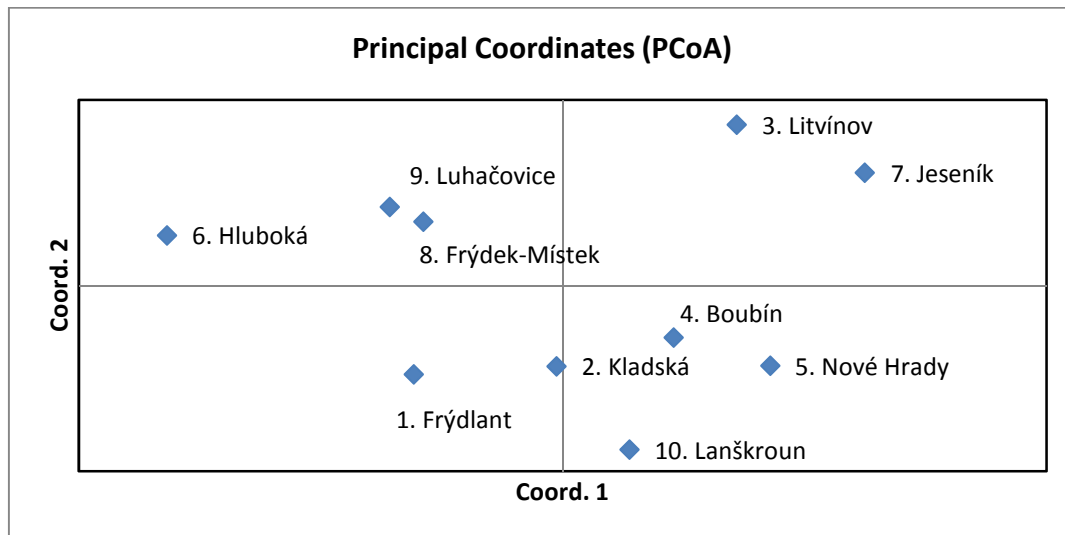
Následující tabulka 6 se sumární statistikou obsahuje ukazatel počtu alel detekovaných na konkrétním lokusu ( $k$ ),  $H_{obs}$  je pozorovaná heterozygotnost,  $H_{exp}$  je očekávaná heterozygotnost, PIC *polymorphic information content* slouží jako ukazatel míry informativní hodnoty lokusu, HW je odchylka od Hardyho-Weinbergovy rovnováhy (ND= analýza nemohla proběhnout, NS= odchylka se nevyskytla, \*\*\*= odchylka se vyskytla) a F (Null) je hodnota ukazatele potenciálního výskytu nulových alel. Informativně vysoce hodnotné jsou především mikrosatelitové markery CSOLFAGUS\_31, MFC5, CSOLFAGUS\_19 a CSOLFAGUS\_06. Tyto lokusy vykazují vysokou míru detekovaných alel, minimální rozdíl mezi očekávanou a pozorovanou heterozygotností, údaj PIC, který ukazuje jakou sílu má lokus ve vylisování variability, se blíží hodnotě 1, tedy jeho vliv na detekci polymorfismu je značný. Je však důležité zdůraznit, že i samostatně méně informativní lokus přiřazený do souboru současně generovaných dat významně navyšuje informativní hodnotu.

Tabulka 6 Souhrnná charakteristika parametrů polymorfismu – buk lesní

	Lokus	k	Hobs	Hexp	PIC	HW	F (null)
M1	CONCAT14	4	0,475	0,49	0,457	Ns	0,0159
	EMILY	6	0,768	0,771	0,732	Ns	-0,0017
	CSOLFAGUS_31	13	0,859	0,859	0,843	Ns	-0,0022
	MFC11	9	0,357	0,617	0,594	***	0,2528
	DE576	7	0,704	0,669	0,615	Ns	-0,0276
	CSOLFAGUS_05	8	0,669	0,678	0,638	Ns	0,0108
	FS1_03	14	0,527	0,625	0,598	**	0,0898
	MFC5	22	0,654	0,904	0,895	***	0,1592
	CSOLFAGUS_19	13	0,798	0,845	0,825	Ns	0,0291
	CSOLFAGUS_06	12	0,855	0,867	0,851	Ns	0,0065
	SFC0036	8	0,779	0,774	0,746	Ns	-0,0048
	MFC7	9	0,578	0,596	0,559	Ns	0,0134
	ERHBI	6	0,529	0,553	0,513	Ns	0,0304
	M2	EEU75	12	0,808	0,803	0,774	Ns
FAGSYL_002929		11	0,766	0,731	0,695	Ns	-0,0261
FAGSYL_003849		14	0,812	0,803	0,778	Ns	-0,0056
DZ447		4	0,587	0,589	0,542	Ns	0,0048
CSOLFAGUS_29		8	0,435	0,437	0,402	Ns	0,0044
FAGSYL_001018		9	0,388	0,664	0,618	***	0,2759
DUKCT		9	0,558	0,578	0,511	Ns	0,0175
FAGSYL_003093		15	0,222	0,591	0,551	***	0,4533

## 2.7. Prostorová populačně-genetická analýza

Mikrosatelitová data testovací populace byla analyzována z hlediska populační struktury. Byl generován grafický výstup s využitím software GenAlEx 6.5 (<http://biology-assets.anu.edu.au/GenAlEx/Welcome.html>). Byla provedena analýza hlavních koordinát (PCoA, obr. 14), jde o metodu, která snižuje dimenzionalitu dat pro účely grafického zobrazení.



Obrázek 14 Analýza hlavních koordinát (PCoA) – buk lesní

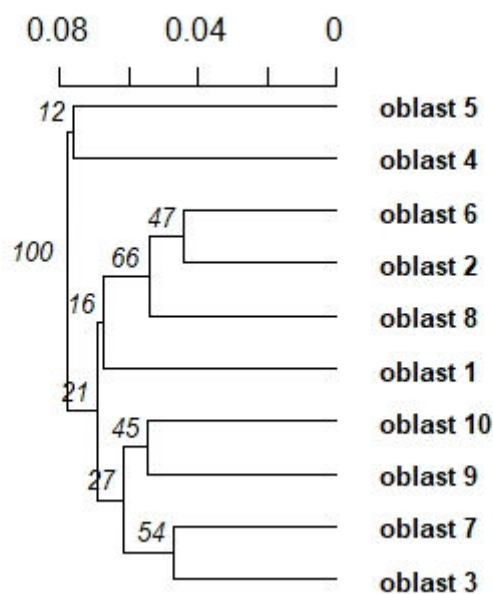
V analýze hlavních koordinát (obrázek 14) vysvětluje první kvadrant menší geografickou vzdálenost mezi populacemi odebranými v LS Luhačovice a LS Frýdek – Místek. Do tohoto segmentu se řadí i populace z LS Hluboká, která je způsobena menší genetickou variabilitou. V rozmezí hranic druhého kvadrantu se nacházejí LS Litvínov a LS Jeseník, které vykazují taktéž menší genetickou variabilitu. Třetí kvadrant vylišuje populaci z LS Frýdlant, která odpovídá i geografické izolovanosti od ostatních populací. V posledním čtvrtém kvadrantu jsou vylišovány populace z LS Kladské, LS Boubín, LS Nové Hrady a LS Lanškroun, kdy LS Boubín a LS Nové Hrady jsou geograficky bližší.

Z bodového grafu je patrné, že toto rozdělení probíhá na základě genetické vzdálenosti analýzou hlavních koordinát PCoA, kde jsou populace rozděleny do čtyř kvadrantů s následujícím zastoupením populací:

1. Kvadrant – Populace 6, 9, 8
2. Kvadrant – Populace 7, 3,
3. Kvadrant – Populace 1,2,
4. Kvadrant – Populace 4, 5,10.

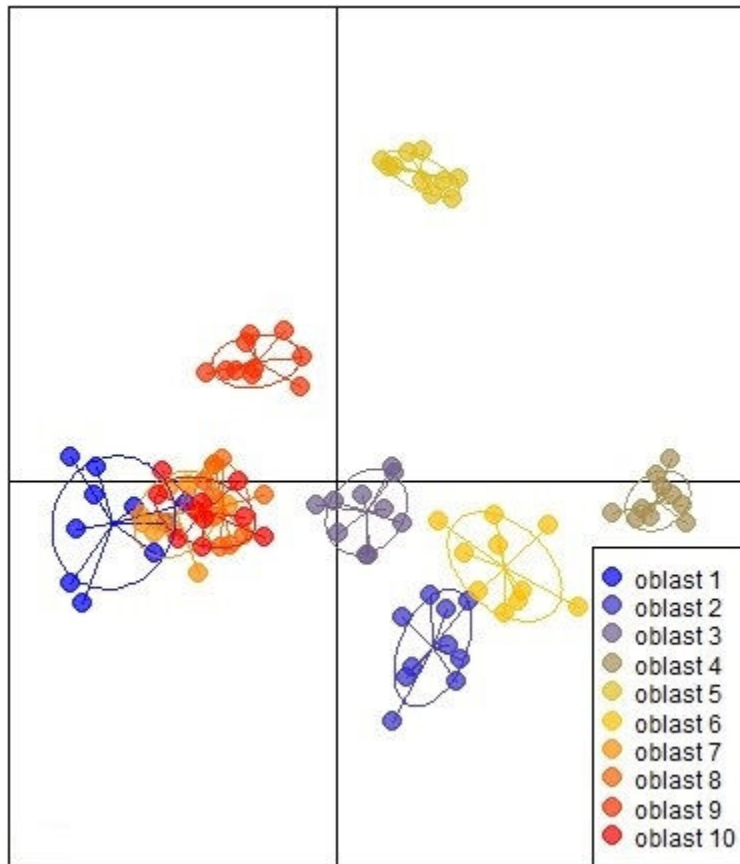
Závěry analogické k závěrům PCoA byly získány z dendrogramu metodou rozkládání na základě podobností genetické příbuznosti, která je vyobrazena na grafu UPGMA vytvořeném za pomoci programu R (obrázek 15) na základě matice genetických vzdáleností vycházející z údajů o alelových frekvencích. Dendrogram vychází z klastrové analýzy (*Cluster Analysis*), která je vhodnou metodou pro zhodnocení vícerozměrných dat a nalezení skupin uvnitř datového souboru.

V diagramu lze pozorovat dva hlavní shluky populací, přičemž jeden zahrnuje populace 5 (LS Nové Hrady) a 4 (LS Boubín) a druhý zahrnuje populace 6 (LS Hluboká), 2 (LS Kladská), 8 (LS Frýdek Místek), 1 (LS Frýdlant), 10 (LS Lanškroun), 9 (LS Luhačovice), 7 (LS Jeseník) a 3 (LS Litvínov), která se dále dělí na podskupiny vylišující populace 6, 2, 8, 1 a druhou podskupinu 10, 9, 7 a 3. Největší podobnost ukazují populace 5 a 4, následované ve shluku populacemi 7, 3.



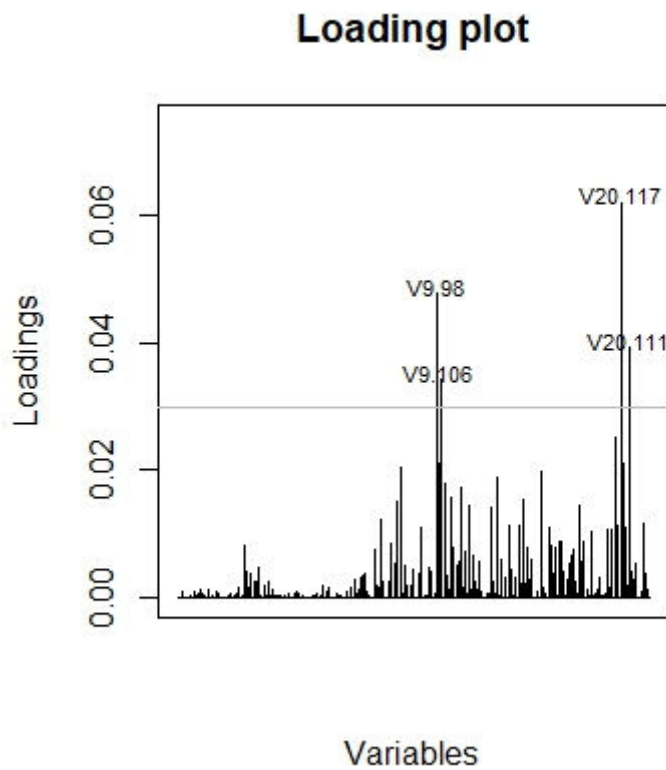
Obrázek 15 Dendrogram UPGMA – buk lesní

Další graf je obdobou analýzy PCoA i dendrogramu UPGMA. Grafický výstup (obr. 16) vytvořený za pomoci programu R využívá metodu diskriminační analýzy hlavních komponent - DAPC (JOMBART ET AL., 2010). Jde o multivarietní metodu klastrování geneticky příbuzných jedinců, kdy jsou data pro redukci dimenzionality nejprve transformována pomocí analýzy hlavních komponent (PCA) a následně je provedena diskriminační analýza (DA). Z grafu je patrné, že v největším překryvu – tedy geneticky nejpodobnější jsou oblasti 1 (LS Frýdlant), 7 (LS Jeseník), 8 (LS Frýdek Místek) a 10 (LS Lanškroun), z nichž nejvíce geograficky příbuzné jsou populace 7 a 10.



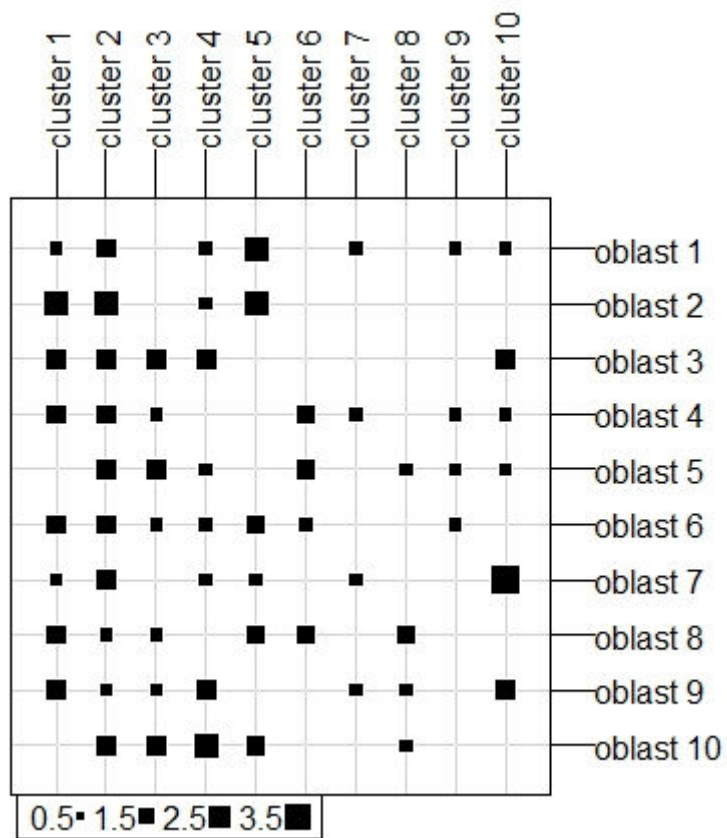
Obrázek 16 Graf DAPC – buk lesní

Obrázek 17 znázorňuje míru vlivu jednotlivých lokusů na rozklastrování podle jejich detekované genetické variability. Největší podíl na rozklastrování má lokus č. 9 (SFC0036), a to konkrétně alely délek 98 a 106 bp a lokus 19 (EMILY) s délkami alel 111 a 117 bp.



Obrázek 17 Vliv jednotlivých lokusů na rozklastrování - buk lesní

Grafický výstup (obr. 18) vylišuje příbuzenské clustery studovaných skupin jedinců. Výchozí hypotézou je tvrzení, že každá vzorkovaná populace je samostatnou genetickou skupinou, což vytváří schéma 10 clusterů x 10 populací. Velikost a počet černých čtverečků pak prezentuje skutečnou diferenciaci genetické diverzity jedinců každé populace. Tato genetická vzdálenost je graficky vyobrazena právě na zmíněném obrázku 18. Populace - oblast 10 se zároveň nejvíce geneticky blíží clusterům 2, 3, 4, 5 a 8. Tento graf se dá uchopit i obráceně, kdy mezi nejpříbuznější u clusteru 5 se řadí jedinci z populací 1, 2, 6, 8, 10 a 7.



Obrázek 18 Distribuce genetické variability do 10 klasterů – buk lesní



### 3. Dub zimní

#### 3.1. Charakteristika dubu zimního (*Quercus petraea* [Mattuschka] Liebl.)

Dub zimní (*Quercus petraea* [Mattuschka] Liebl.) je hlavní dřevinou původních doubrav pahorkatin České republiky, s areálem rozšíření pokrývajícím podstatnou část Evropy, s výjimkou chladného severu a kontinentálně laděného východu. Je ihned po buku, spolu s dubem letním, naší hospodářsky nejvýznamnější listnatou dřevinou. Využíván je stejně jako dub letní pro získávání kvalitní dřevní hmoty určené k mnohostrannému použití.

Dub zimní je dřevinou vyskytující se přirozeně na území Evropy. Nevyskytuje se na severu, z důvodu chladného klimatu a také se dub zimní nevyskytuje ve východní části Evropy. Ve východní Evropě je pro dub zimní limitním faktorem kontinentalita. V severní části areálu výskytu dosahuje dub zimní jen do nejteplejší části Skandinávie. Oproti tomu areál dubu letního zasahuje poměrně daleko na sever do území Skandinávie. Východními hranicemi dubu zimního jsou Bělorusko, Středomořská pahorkatina a střední tok řeky Volhy. Na rozdíl od dubu letního tedy nezasahuje do oblasti Ruska. V jihovýchodní části areálu se dub vyskytuje v oblasti Kavkazu, Krymu a Malé Asie. V oblasti Středozemního moře obsazuje dub zimní celý Balkánský poloostrov, Apeninský poloostrov a také další ostrovy ve Středozemním moři. V této oblasti tedy dub zimní svým areálem předčí dub letní. V západní části Evropy je hranice areálu výskytu jak dubu letního, tak dubu zimního přibližně stejná. Zde se oba druhy dubů vyskytují v severní části Pyrenejského poloostrova, ve Francii a na Britských ostrovech.

Rozšíření dubu zimního v rámci našeho území je v souladu s rozšířením v rámci střeoevropského standardu. Dub zimní na našem území osidluje především teplejší pahorkatiny a horní hranice jeho rozšíření se prolíná s dolní hranicí rozšíření buku. Porosty dubu zimního ve směsi s dalšími dřevinami se v Čechách vyskytují především v oblasti Berounky, dolního Povltaví, na okrajích Polabí a Poohří, dále v teplých oblastech Českého středohoří a také Doupovských hor. V roce 2016 duby zaujímaly celkem 7,2 % z celkové porostní plochy, což odpovídá výměře 186 718 hektarů. Výměra porostní plochy, na které se duby nacházejí, vykazuje v posledních letech trend stálého růstu. Přirozená druhová skladba byla rekonstruována jako skladba přirozených lesních společenstev, které by se v daných přírodních podmínkách za současného klimatu vyvinuly bez zásahu člověka. Procentuální

hodnota pro přirozené zastoupení dubů v lesních porostech je 19,4 %. Doporučená dřevinná skladba představuje ekonomicky, ekologicky a funkčně optimalizované zastoupení dřevin, které zaručuje vyvážené plnění produkčních a mimoprodukčních funkcí lesa. Tato hodnota je pro duby 9 % (ZELENÁ ZPRÁVA, 2016).

Dub zimní (*Quercus petraea*) je dřevinou původní v České republice a schopnost rozlišení jedinců mezi sebou nebo jednotlivých populací dubu zimního navzájem může sloužit k zachování původních populací a racionálnímu přístupu k přenosu genetického materiálu mezi populacemi.

### 3.2. Genom dubu zimního

Rod *Quercus* je často mezi taxonomisty označován jako velmi složitý a nejednoznačně vymezený. Systematika tohoto rodu je komplikovaná a kontroverzní, a to se odráží v různém počtu druhů, které uznávají různí autoři (GÖMÖRY ET AL., 2001). V minulosti bylo navrženo, že celý rod *Quercus* je tvořen pouze dvanácti druhy (LINNAEUS, 1753). Od této doby vzrostl počet dubových taxonů. V roce 1964 bylo považováno 320 taxonů za samostatné druhy, a dále ještě bylo vymezováno mnoho forem, odrůd a poddruhů.

Napříč přirozeným rozšířením vykazuje druh *Quercus petraea* velkou genetickou rozmanitost, která byla hodnocena různými genetickými a molekulárními markery, bez významného geografického vzoru (ZANETTO, ROUSSEL AND KREMER, 1994). Naproti tomu fenotypové rysy vykazují silné geografické a výškopisné trendy variability a také vykazují velkou populační diferenciaci (DUCOUSSO, GUYON AND KREMER, 1996). Tato variabilita je důsledkem dynamiky postglaciální migrace (PETIT ET AL., 2004), různorodé selekce (KREMER, ZANETTO AND DUCOUSSO, 1997) a přenosem pylu mezi jedinci (STREIFF ET AL., 1999).

### 3.3. Vlastní výběr mikrosatelitových markerů

Při prvotním vyhledávání existujících markerů bylo v odborných článcích nalezeno celkem 57 potenciálně vhodných primerů (tabulka 7). Z tohoto seznamu však musely být vyřazeny primery, které se vyznačovaly nízkou mírou detekovaného polymorfismu nebo se při jejich amplifikaci objevila vysoká míra diference mezi skutečnou a očekávanou mírou heterozygotnosti, čímž se stávaly pro účely této studie méně vhodnými. Takto vyselektované primery byly testovány na izolované DNA dubu zimního. Tabulka 72 nacházející se v přílohách obsahuje číselné značení jedinců, ustálené číslo přírodní lesní oblasti, jméno lesní správy a upřesňující název lokality pro snadnější identifikaci místa odběru.

### 3.4. Seznam testovaných mikrosatelitových markerů

Tabulka 7 Seznam testovaných markerů pro dub zimní

ID	Autor, rok	Název lokusu	ID	Autor, rok	Název lokusu
1	Guichoux <i>et al.</i> , 2011	QrZAG7	30	Guichoux <i>et al.</i> , 2011	ssrQrZAG 102
2		MsQ13	31		ssrQrZAG 103
3		QrZAG112	32		ssrQrZAG 108
4		QrZAG20	33		ssrQrZAG 111
5		QpZAG15	34		ssrQrZAG 121
6		†QpZAG110	35	Steinkellner <i>et al.</i> , 1997	ssrQpZAG1/2
7		QrZAG96	36		ssrQpZAG1/5
8		†QrZAG11	37		ssrQpZAG16
9	Steinkellner <i>et al.</i> , 1997	ssrQrZAG 2	38		ssrQpZAG3/64
10	Guichoux <i>et al.</i> , 2011	ssrQrZAG 4	39		ssrQpZAG3/62
11		ssrQrZAG 5	40		ssrQpZAG7
12		ssrQrZAG 18	41		ssrQpZAG9
13		ssrQrZAG 25	42		ssrQpZAG15
14		ssrQrZAG 30	43		ssrQpZAG25
15		ssrQrZAG 31	44		ssrQpZAG36
16		ssrQrZAG 39	45		ssrQpZAG46
17		ssrQrZAG 44	46		ssrQpZAG58
18		ssrQrZAG 56	47		ssrQpZAG102
19		ssrQrZAG 58	48		ssrQpZAG104
20		ssrQrZAG 59	49		ssrQpZAG108
21		ssrQrZAG 65	50		ssrQpZAG110
22		ssrQrZAG 73	51		ssrQpZAG119
23		ssrQrZAG 74	52	Streiff <i>et al.</i> , 1998	MSQ4

24		ssrQrZAG 75	53		MSQ13
25		ssrQrZAG 77	54		AG36
26		ssrQrZAG 87	55		AG9
27		ssrQrZAG 90	56		AG104
28		ssrQrZAG 95	57		AG1/5
29		ssrQrZAG 101			

Po výběru mikrosatelitových markerů následuje řada na sebe navazujících úkonů, které vedou k finálnímu sestavení multiplexů. Nejprve jsou mikrosatelitové markery jsou separátně namnoženy pomocí PCR reakce, dále jsou testovány na horizontální a vertikální elektroforéze, na kterých se detekuje amplifikace markerů a přítomnost polymorfismu. Tyto markery jsou pak dále testovány a shlukovány do multiplexů. Multiplex musí splňovat kritéria odlišné délky amplifikovaných fragmentů naznačených stejnou fluorescenční barvou, primerové páry nesmí vytvářet v reakční směsi dimery a musí se shodovat podmínky PCR reakce, tedy především teplota annealingu. Výsledkem celého procesu byl výběr 18 primerových párů, které byly sdruženy do 2 multiplexů M1 a M2.

### 3.5. Vytvořené multiplexy M1 a M2 pro dub zimní

Tabulka 8 Protokol dubu zimního pro multiplexy M1 a M2

Multiplex 1		Délka (bp)	Objemy	Program	Reakce
1	PIE239	70-100	0,300 ul	95°C 5min	DNA 1 ul
2	PIE227	150-180	0,150 ul	95°C 45s	primery 3,42 ul
3	PIE271	180-220	0,150 ul	35x 60°C 60s	H <sub>2</sub> O 0,48 ul
4	PIE267	80-110	0,075 ul	72°C 45s	Type-It 4,9 ul
5	PIE258	125-160	0,300 ul	72°C 30min	
6	PIE020	95-120	0,135 ul	4°C ∞	
7	PIE152	240-260	0,300 ul		celkem 9,8 ul
8	QrZAG112	75-110	0,075 ul		
9	PIE102	140-170	0,090 ul		
10	PIE243	200-230	0,135 ul		
			1,710 ul		
Multiplex 2		Délka (bp)	Objemy	Program	Reakce
1	QpZAG15	100-160	0,165 ul	95°C 5min	DNA 1 ul
2	QpZAG110	210-230	0,15 ul	95°C 45s	primery 2,58 ul
3	QrZAG96	130-200	0,165 ul	35x 60°C 60s	H <sub>2</sub> O 0,32 ul
4	QrZAG11	220-300	0,375 ul	72°C 45s	Type-It 3,9 ul
5	QrZAG7	110-170	0,09 ul	72°C 30min	
6	PIE223	200-230	0,09 ul	4°C ∞	
7	PIE242	100-130	0,12 ul		celkem 7,8 ul
8	QrZAG020	150-200	0,135 ul		
			1,29 ul		

Pozn. Uvedený protokol je platný pro koncentraci DNA 20 ng/ul a koncentraci primerů 10mM

Tabulka 8 obsahuje jeden ze stěžejních dílčích výstupů, a to sestavené a otestované multiplexy pro analýzu genetické struktury dubu zimního. Sestavené multiplexy byly testovány na vybraných populacích dubu zimního na území České republiky. Multiplexy jsou konečným výsledkem testování výchozích 57 primerových párů.

První ze dvou multiplexů obsahuje 10 primerových párů a druhý čítá celkem 8 mikrosatelitových párů, celkem je tedy generována informace o 18 mikrosatelitových lokusech. Oligonukleotidové sekvence vybraných primerů jsou uvedeny v tabulce 9.

Barevné označení u názvu lokusu odpovídá barvě fluorescenčního značení forward primeru (červená (PET), zelená (VIC), modrá (FAM), žlutá (NED)). Dále je uveden délkový rozsah ampliconů pozorovaný v testovací populaci, objem pracovní koncentrace primerů (je

uveden objem pro jeden z primerového páru, objem druhého primeru je totožný), podmínky PCR a celkový objem reakce pro jeden vzorek.

Teplota annealingu pro oba multiplexy je 60°C při 35 cyklech polymerázové řetězové reakce.

Tabulka 9 Nukleotidové sekvence markerů začleněných do multiplexů - dub zimní

Multiplex 1					
Autor	Lokus	Forward	Reverse	Repetice	Bp
Durand et al., 2010	PIE 239	TCAACAAATGGCTCAACAGTG	CCCATTTGGTAGCAAAGAGTC	AT	83–94
	PIE 227	TACCATGATCTGGGAAGCAAC	AAGGGCTTGGTTGGGTTAGT	TGG	149–181
	PIE 271	CACACTACCAACCCTACCC	GTGCGGTTGTAGACGGAGAT	TC	184–220
	PIE 267	TCCAACCATCAAGGCCATTAC	GTGCGAACAGATCCCTTGTC	AG	82–108
	PIE 258	TTCTCGATCTCAAACAAAACCA	TTTGATTTGTTTAAGGAAAATTGGA	TC	129–163
	PIE 020	GCAGAGGCTCTTCTAAATACAGAACT	GGGAGGTTTCTGGGAGAGAT	AG	97–113
	PIE 152	TGTACCTCTTCTCTCTAAACT	GAATTTCTAAACACTAGCATTGAC	TA	235–259
	PIE 102	ACCTTCCATGCTCAAAGATG	GCTGGTGATACAAGTGTGG	CT	142–167
	PIE 243	GGGGTCAGTAGGCAAGTCTTC	GAGTGCATATTTCTTAGTCAG	AG	205–226
	Kampfer et al. 1998	QrZAG 112	TTCTTGCTTTGGTGCGCG	GTGGTCAGAGACTCGGTAAGTATTC	GA
Multiplex 2					
Autor	Lokus	Forward	Reverse	Repetice	Bp
Steinkellner et al. 1997	QpZAG 15	CGATTTGATAATGACACTATGG	CATCGACTCATTGTTAAGCAC	AG	104–155
	QpZAG 110	GGAGGCTTCCTCAACCTACTT	GATCTCTGTGTGCTGTATTTTT	AG	204–237
Kampfer et al. 1998	QrZAG96	CCCAGTCACATCCACTACTGTCC	GGTTGGGAAAAGGAGATCAGA	TC	138–187
	QrZAG 11	CCTTGAACCGAAGGTGTCC	TGGTTGACTAAAGTATGAACTGTTG	TC	223–268
	QrZAG 7	CAACTGGTGTTCCGGATCAA	GTGCATTTCTTTATAGCATTAC	TC	113–164
	QrZAG 20	CCATTAAGAAGCAGTATTTGT	GCAACTCAGCCTATATCTAGAA	TA	157–196
Durand et al., 2010	PIE 223	TAGAAGCCCAACACGGCTAC	AGCAAAACACAAACGCACAA	GGT	200–225
	PIE 242	TGGAGGGAAAAGAACAATGC	TTGCAATCTCCAAATTTAATG	TA	104–127

### 3.6. Genetická struktura testovací populace dubu zimního

K analýze genetické variability dubu zimního bylo předem vytipováno celkem deset lokalit. Tyto lokality byly zvoleny zejména z důvodu předpokládané autochtonnosti porostů. Tento předpoklad se zakládal na dokumentaci o původu porostů. Dalším předpokladem pro zvolení konkrétních populací bylo jejich rozmístění na území České republiky. Pro zachycení genetické variability dubu zimního jako druhu na území České republiky bylo vhodné, aby byly populace určené k analýze rozmístěny na co nejširším území. Základní soubor testovací populace tvoří 10 jedinců z každé z deseti lokalit. Počet sto jedinců je pro genetickou analýzu generalizující oblast celé České republiky statisticky nedostatečný. Testovací populace však byla analyzována především za účelem demonstrace diskriminační síly vytvořeného markeru, nikoliv jako rigorózní studie genetické diverzity.

Tabulka 10 se sumární statistikou obsahuje ukazatel počtu alel detekovaných na konkrétním lokusu ( $k$ ),  $H_{obs}$  je pozorovaná heterozygotnost,  $H_{exp}$  je očekávaná heterozygotnost, PIC *polymorphic information content* je ukazatelem míry informativní hodnoty lokusu, HW je odchylka od Hardyho-Weinbergovy rovnováhy (ND= analýza nemohla proběhnout, NS= odchylka se nevyskytla, \*\*\*= odchylka se vyskytla) a F (Null) je hodnota ukazatele potenciálního výskytu nulových alel. Informativně vysoce hodnotné jsou především mikrosatelitové markery PIE\_258, QrZAG\_7, PIE\_242, QrZAG020, QrZAG\_96, QpZAG\_15 a QpZAG\_110. Tyto lokusy vykazují vysokou míru detekovaných alel, minimální rozdíl mezi očekávanou a pozorovanou heterozygotností, údaj PIC, který ukazuje jakou sílu má lokus ve vylišování variability, se blíží hodnotě 1, tedy jeho vliv na detekci polymorfismu je značný. Je však důležité zdůraznit, že i samostatně méně informativní lokus přiřazený do souboru současně generovaných dat významně navyšuje informativní hodnotu.

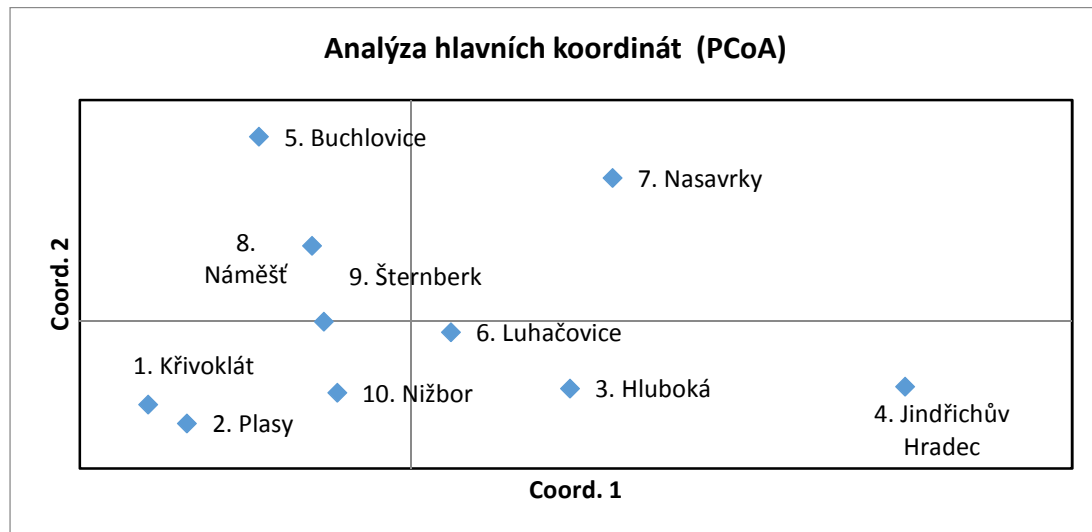


Tabulka 10 Souhrnná charakteristika parametrů polymorfismu – dub zimní

	Locus	K	HObs	HExp	PIC	HW	F(Null)
M1	PIE_020	9	0.700	0.685	0.639	NS	0.0495
	PIE_152	11	0.556	0.815	0.785	ND	0.2309
	QrZAG_112	7	0.450	0.432	0.397	***	0.2952
	PIE_102	18	0.760	0.786	0.767	*	0.0549
	PIE_243	10	0.687	0.749	0.702	*	0.0451
	PIE_267	11	0.770	0.799	0.768	ND	0.0608
	PIE_258	28	0.760	0.908	0.897	ND	0.1674
	PIE_239	6	0.040	0.197	0.190	***	0.8483
	PIE_227	9	0.700	0.693	0.641	**	0.0634
	PIE_271	10	0.790	0.800	0.767	NS	0.0748
M2	QrZAG_7	22	0.835	0.942	0.934	ND	0.1107
	PIE_223	8	0.606	0.594	0.564	***	0.1676
	PIE_242	12	0.816	0.878	0.861	ND	0.0440
	QrZAG020	17	0.866	0.887	0.872	ND	0.0587
	QrZAG_96	22	0.818	0.909	0.897	ND	0.0400
	QrZAG_11	19	0.714	0.798	0.770	***	0.1035
	QpZAG_15	20	0.561	0.827	0.805	***	0.2221
	QpZAG_110	17	0.792	0.852	0.838	***	0.0685

### 3.7. Prostorová populačně-genetická analýza

Mikrosatelitová data testovací populace byla analyzována z hlediska populační struktury. Byl generován grafický výstup s využitím software GenAlEx 6.5 (<http://biology-assets.anu.edu.au/GenAlEx/Welcome.html>). Byla provedena analýza hlavních koordinát (PCoA, obr. 19), jde o metodu, která snižuje dimenzionalitu dat pro účely grafického zobrazení.



Obrázek 19 Analýza hlavních koordinát (PCoA) –dub zimní

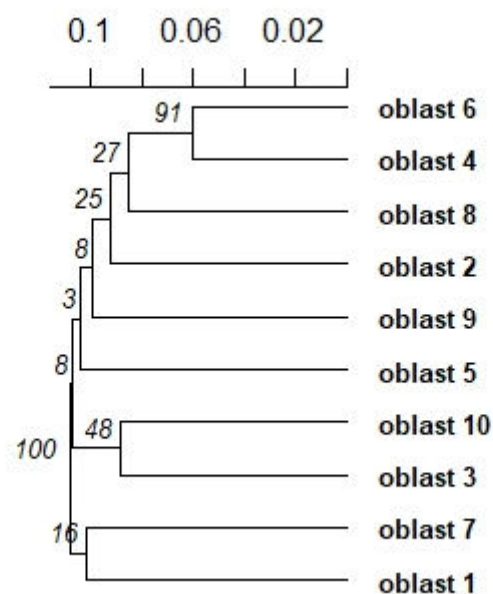
V analýze hlavních koordinát (obrázek 19) vysvětluje první kvadrant menší genetickou variabilitu mezi populacemi 5 (LS Buchlovice), 8 (LS Náměšť) a 9 (LS Šternberk), i přesto je tu však jasně patrný dopad geografické vzdálenosti. V rozmezí hranic druhého kvadrantu se nachází populace 7 (LS Nasavrky), které svou izolovaností kopírují geografickou vzdálenost. Třetí kvadrant obsahuje populace 1 (LS Křivoklát), 2 (LS Plasy) a 10 (LS Nižbor), které jsou navzájem nejvíce geneticky ovlivněné v závislosti na geografickou blízkost. V posledním čtvrtém kvadrantu jsou vylišovány populace 6 (LS Luhačovice), 3 (LS Hluboká) a 4 (LS Jindřichův Hradec), které stejně jako první kvadrant odrážejí jak genetickou tak geografickou vzdálenost.

Z bodového grafu je patrné, že toto rozdělení probíhá na základě genetické vzdálenosti analýzou hlavních koordinát PCoA, kde jsou populace rozděleny do čtyř kvadrantů s následujícím zastoupením populací:

1. Kvadrant – Populace 5, 8, 9,
2. Kvadrant – Populace 7,
3. Kvadrant – Populace 1, 2, 10
4. Kvadrant – Populace 6, 3, 4.

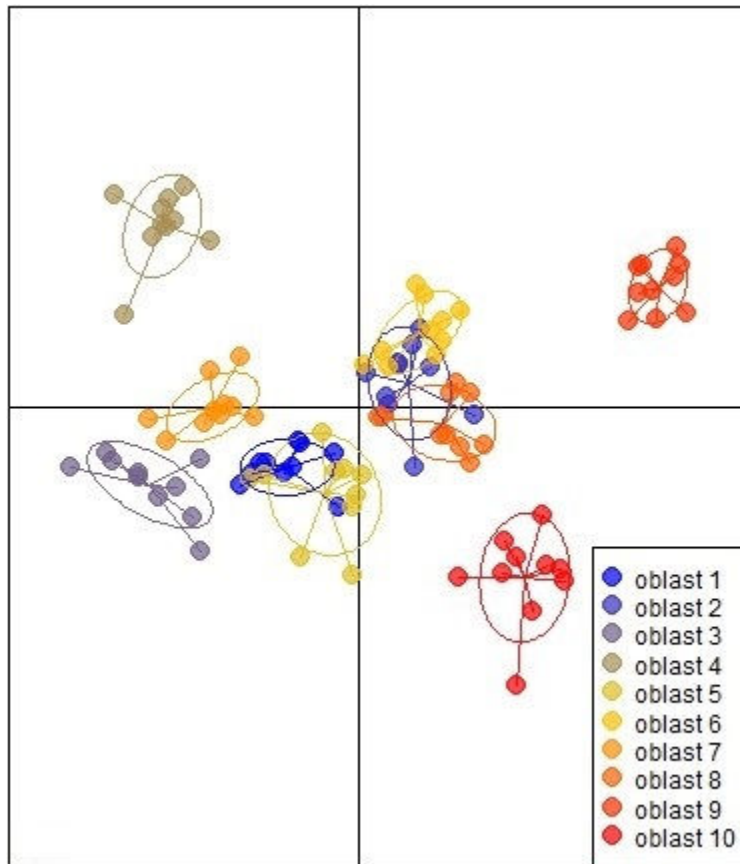
Závěry analogické k závěrům PCoA byly získány i z dendrogramu metodou rozkládání na základě podobností genetické příbuznosti, která je vyobrazena na grafu UPGMA vytvořeném za pomoci programu R (obrázek 20) na základě matice genetických vzdáleností vycházející z údajů o alelových frekvencích. Dendrogram vychází z klastrové analýzy (*Cluster Analysis*), která je vhodnou metodou pro zhodnocení vícerozměrných dat a nalezení skupin uvnitř datového souboru.

V diagramu lze pozorovat dva hlavní shluky populací, přičemž jeden zahrnuje populace 7 (LS Nasavrky) a 1 (LS Křivoklát) a druhá větev zahrnuje populace 6 (LS Luhačovice) a 4 (LS Jinřichův Hradec), 8 (Náměšť), 2 (LS Plasy), 9 (LS Šternberk), 5 (LS Buchlovice), 10 (LS Nižbor) a 3 (LS Hluboká). Největší podobnost ukazují populace 6 a 4, které jsou si i geograficky blízko. Potvrdila se izolovanost populace 7.



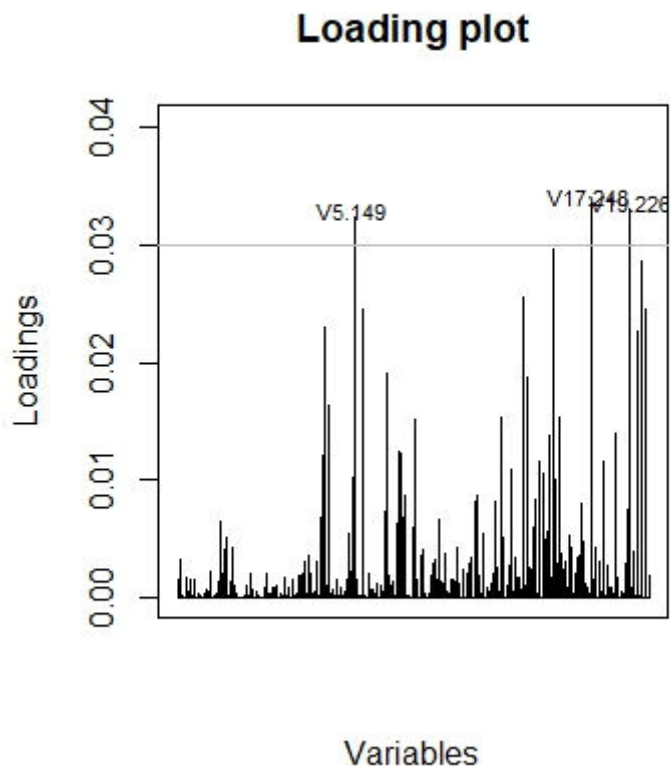
Obrázek 20 Graf UPGMA – dub zimní

Další graf je obdobou analýzy PCoA i dendrogramu UPGMA. Grafický výstup (obr.21) vytvořený za pomoci programu R využívá metodu diskriminační analýzy hlavních komponent - DAPC (JOMBART ET AL., 2010). Jde o multivarienní metodu klastrování geneticky příbuzných jedinců, kdy jsou data pro redukci dimenzionality nejprve transformována pomocí analýzy hlavních komponent (PCA) a následně je provedena diskriminační analýza (DA). Z grafu je patrné, že nejvíce se překrývají oblasti 2 (LS Plasy), 6 (LS Luhačovice) a 8 (LS Náměšť) a populace z oblastí 1 (Křivoklát) a 5 (LS Buchlovice).



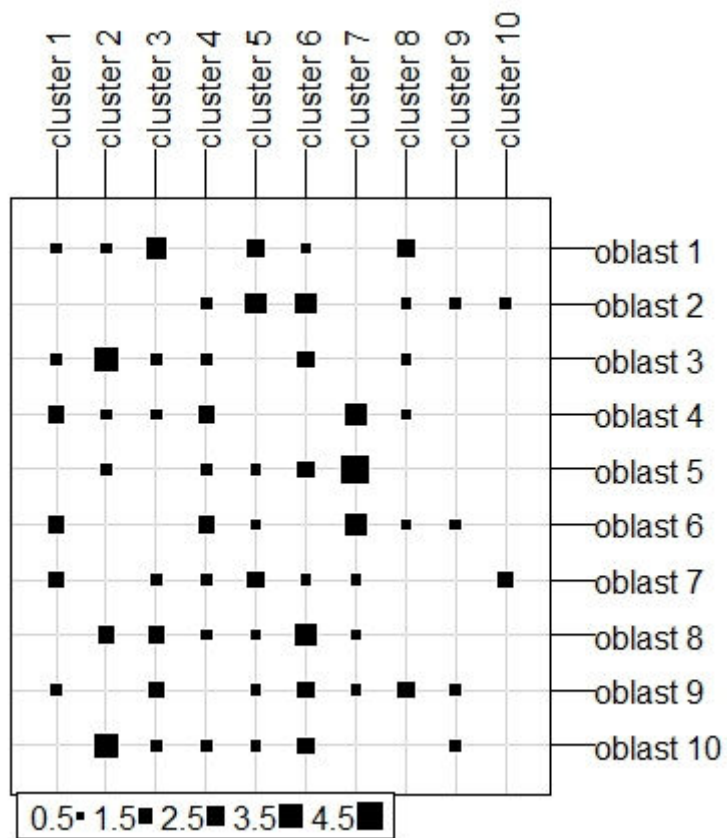
Obrázek 21 Graf DAPC – dub zimní

Obrázek 22 znázorňuje míru vlivu jednotlivých lokusů na rozklastrování podle jejich detekované genetické variability. Největší podíl na rozklastrování má lokus č. 5 (PIE\_102), a to konkrétně alela o délce 149 bp, lokus č. 17 (QrZAG\_11) s délkou alely 248 bp a lokus č. 19 (QpZAG\_110) s alelou o délce 226 bp.



Obrázek 22 Vliv jednotlivých lokusů na rozklastrování – dub zimní

Grafický výstup (obr. 23) vylučuje příbuzenské clustery studovaných skupin jedinců. Výchozí hypotézou je tvrzení, že každá vzorkovaná populace je samostatnou genetickou skupinou, což vytváří schéma 10 clusterů x 10 populací. Velikost a počet černých čtverečků pak prezentuje skutečnou diferenciaci genetické diverzity jedinců každé populace. Tato genetická vzdálenost je graficky vyobrazena právě na zmíněném obrázku 23. Z tohoto grafu vychází, že pro oblast clusteru 7 jsou nejpříbuznější populace 4, 5 a 6. Naopak například populace - oblast 10 je součástí clusterů 2, 6, 3, 4, 5 a 9.



Obrázek 23 Distribuce genetické variability do 10 klasterů – dub zimní

## 4. Jedle bělokorá

### 4.1. Charakteristika jedle bělokoré (*Abies alba* Mill.)

Jedle bělokorá (*Abies alba* Mill.) je jehličnatý druh patřící do čeledi borovicovitých (*Pinaceae*). Obecně dřeviny čeledi borovicovité jsou jednodomé, vždyzelené a velmi vzácně opadavé. Pryskyřičné kanálky se můžou nacházet v kůře, lýku, dřeňových paprscích a v mladém dřevě (CHRTEK ET AL., 1988). Dřevo jedle bělokoré bez jádra a pryskyřičných kanálků má široké upotřebení, v dřívějších dobách se mu dávala přednost jako dřevu stavebnímu, zatímco dřevo smrkové se více cenilo na výrobu prken (MADĚRA A ÚRADNÍČEK, 2001). Jedle bělokorá je lesnicky pěstovaná dřevina, která poskytuje dřevo podobných vlastností jako smrk ztepilý (*Picea abies*), které má široké uplatnění - ve vodním stavitelství, výrobě hudebních nástrojů a nábytku, budování staveb, jako palivové dříví. (CHRTEK ET AL., 1988). Z pohledu lesního ekosystému hraje jedle bělokorá velice důležitou roli jako stabilizující prvek. Dožívá se 500 let a dorůstá do výšky až 60 m. Je autochtonní dřevinou na území České republiky. Hlavním těžištěm výskytu jsou příhraniční oblasti a vnitrozemské polohy s vyšší nadmořskou výškou. S menší intenzitou sestupuje do oblasti pahorkatin, ale zřídka kdy překročí nadmořskou výšku 1100 m (ÚRADNÍČEK ET AL., 2009).

V minulosti byla jedle bělokorá významnou dřevinou s přirozeným zastoupením 19,8% (ZELENÁ ZPRÁVA, 2016). Avšak pro období mezi 14. – 16. stoletím je považována za expanzivní druh, která se šíří na úkor buku lesního (*Fagus sylvatica*). Dle historických pramenů činilo její zastoupení v porostech na Českomoravské vrchovině až 58% (MÁLEK 1962, 1983). Od 19. století byly pozorovány náznaky odumírání jedle bělokoré v porostech. Nejdříve se tak dělo v geograficky ohraničených oblastech, později bylo odumírání pozorováno v rámci celého areálu jejího rozšíření (BERGMANN ET AL., 1990). Hlavní příčinou radikálního snížení zastoupení jedle bělokoré bylo nejen holosečné hospodaření, ale také antropogenní zatížení (fytotoxické imise) v důsledku rychlého rozvoje průmyslu. Dle Bučka (2006) bylo již v roce 1866 doloženo hynutí jedlových porostů v Ostravském biogeografickém regionu. Mezi lety 1950 a 2001 došlo ke snížení zastoupení z 2,9% na 0,9% a naopak ke zvýšení středního věku z 63 let na 76 let. Výrazně tedy převládají staré a přestárlé jedle. V současné době je snahou lesníků navyšování zastoupení jedle bělokoré v porostech, čímž se optimalizuje biodiverzita a



ekologická stabilita daných stanovišť. V důsledku poklesu zastoupení jedle bělokoré se projevily ztráty nejen v oblasti ekologického významu, ale i ztráty ekonomické – jelikož je jedním z nejproduktivnějších evropských druhů. Ve směsi s buken lesním (*Fagus sylvatica*) a smrkem ztepilým (*Picea abies*) patřila jedle bělokorá (*Abies alba*) k nosným prvkům hospodaření ve středoevropském horském lese. A to zejména pro její zpevňující funkce proti bořivým větrům (MUSIL ET AL., 2007).

V případě jedle bělokoré (*Abies alba* Mill.) je skutečností, že výskyty dospělých stromů mohou reálně představovat pouhé zbytky dřívější, daleko hojnější populace. Tito jedinci proto mají mimořádný význam pro možnost zachování genetických zdrojů i geneticko-šlechtitelský výzkum této dřeviny.

## 4.2. Genom jedle bělokoré

Obecně je snahou zvýšit zastoupení jedle bělokoré, proto byly v minulosti prováděny genetické výzkumy se značnou intenzitou s využitím mitochondriálních DNA markerů, terpenů, isoenzymů, chloroplastových a jaderných mikrosatelitů (KONNERT A BERGMANN 1995; SAGNARD ET AL., 2002; CREMER ET AL., 2006; GÖMÖRY ET AL., 2012)

V reakci na odumírání porostů jedle bělokoré byla provedena studie (populací i soliterně rostoucích jedinců) se zaměřením na změnu ekologických, fyziologických a fenotypových znaků v odezvě na ekologické gradienty. Na základě této studie stanovil Larsen (1986, 1989) následující hypotézu: „Pokles zastoupení jedle bělokoré je v podstatě způsoben nedostatečnou genetickou variabilitou v rámci centrálního a severovýchodního areálu jejího rozšíření. V důsledku toho trpí dané populace obecně nízkou úrovní adaptability.“

### 4.3. Vlastní výběr mikrosatelitových markerů

Na základě rozboru dostupných zdrojů a posouzení kvality amplifikace a míry vylišovaného polymorfismu bylo předselektováno 32 párů jedlových mikrosatelitových primerů. Tyto vybrané primerové páry byly nasyntetizovány (tab. 11). Funkčnost a polymorfismus markerů byl ověřován na testovací populaci jedle bělokoré. Tabulka 75 nacházející se v přílohách obsahuje číselné značení jedinců, číslo přírodní lesní oblasti, název lesní správy a upřesňující název lokality pro snadnější identifikaci místa odběru.

### 4.4. Seznam testovaných mikrosatelitových markerů

Tabulka 11 Seznam testovaných markerů pro jedli bělokorou

ID	Autor, rok	Název lokusu	ID	Autor, rok	Název lokusu
1	Cremer et al. 2006	SF 1	17	Postolache et al. 2014	Aag01
2		SF b4	18		Aag02
3		SF b5	19		Aat03
4		SF g6	20		Aat04
5		SF 50	21		Aat05
6		SF 78	22		Aat06
7		SF 83	23		Aat07
8		SF 239	24		Aat08
9		SF 324	25		Aat09
10		SF 331	26		Aat10
11		SF 333	27		Aat11
12	Hansen et al., 2005	NFF2	28		Aat12
13		NFF3	29		Aat13
14		NFH15	30		Aat14
15		NFH3	31		Aat15
16		NFF7	32		Aat16

Po výběru mikrosatelitových primerů následuje řada na sebe navazujících úkonů, které vedou k finálnímu sestavení multiplexů. Vybrané mikrosatelitové markery jsou namnoženy pomocí PCR reakce, dále jsou testovány na horizontální a vertikální elektroforéze, na kterých se detekuje amplifikace markerů a samotná přítomnost polymorfismu. Tyto markery jsou pak

dále testovány a shlukovány do multiplexů. Multiplex musí splňovat kritéria odlišné délky amplifikovaných fragmentů naznačených stejnou fluorescenční barvou, primerové páry nesmí vytvářet v reakční směsi dimery a musí se shodovat podmínky PCR reakce, tedy především teplota annealingu. Finálně bylo vybráno 26 primerových párů, které byly sdruženy do 2 multiplexů M1 a M2.

#### 4.5. Vytvořené multiplexy M1 a M2 pro jedli bělokorou

Tabulka 12 Protokol jedle bělokoré pro multiplexy M1 a M2

Multiplex 1	délka	objemy	Program	Reakce
1 Aat16	420-440	0,3 ul	1x 95°C 5min	DNA 1 ul primery 7,23 ul H <sub>2</sub> O 0,02 ul Type-It 8,25 ul celkem 16,5 ul
2 SF 324	100-130	0,75 ul	95°C 45s	
3 Aag01	180-230	0,6 ul	33x 57°C 45s	
4 Aat03	140-160	0,525 ul	72°C 60s	
5 Aat06	200-210	0,15 ul	1x 72°C 30min	
6 Aat08	300-320	0,15 ul	1x 4°C ∞	
7 Aat09	150-160	0,06 ul		
8 SF g6	90-130	0,18 ul		
9 Aat01	100-120	0,06 ul		
10 Aag02	220-230	0,09 ul		
11 Aat13	333	0,135 ul		
12 SF b5	130-160	0,15 ul		
13 Aat02	120-130	0,105 ul		
14 Aat05	180-200	0,075 ul		
15 Aat11	250-265	0,09 ul		
16 Aat14	360-390	0,195 ul		
		3,615 ul		
Multiplex 2	délka	objemy	Program	Reakce
1 NFH3	90-160	0,3 ul	1x 95°C 5min	DNA 1 ul primery 4,05 ul H <sub>2</sub> O 0,2 ul Type-It 5,25 ul celkem 10,5 ul
2 Aat07	210-250	0,6 ul	95°C 45s	
3 Aat12	300-340	0,255 ul	33x 60°C 45s	
4 SFb4	140-200	0,195 ul	72°C 60s	
5 Aat15	360-370	0,075 ul	1x 72°C 30min	
6 Aat04	150-180	0,075 ul	1x 4°C ∞	
7 SF 83	203	0,075 ul		
8 Aat10	220-240	0,15 ul		
9 NFF3	120-150	0,135 ul		
10 SF 1	210-230	0,165 ul		
		2,025 ul		

Pozn. Uvedený protokol je platný pro koncentraci DNA 20 ng/ul a koncentraci primerů 10mM

Tabulka 12 obsahuje jeden ze stěžejních dílčích výstupů řešení, a to sestavené a otestované multiplexy pro analýzu genetické struktury jedle bělokoré.

Sestavené multiplexy byly testovány na vybraných populacích jedle bělokoré na území České republiky. Multiplexy jsou konečným výsledkem testování výchozích 32 primerových párů.

První z multiplexů obsahuje 16 primerových párů a druhý multiplex je složen z 10 primerových párů, celkem je tedy generována informace o 26 mikrosatelitových lokusech. Oligonukleotidové sekvence vybraných primerů jsou uvedeny v tabulce 13.

Barevné označení u názvu lokusu odpovídá barvě fluorescenčního značení forward primeru (červená (PET), zelená (VIC), modrá (FAM), žlutá (NED)). Dále je uveden délkový rozsah amplikonů pozorovaný v testovací populaci, objem pracovní koncentrace primerů (je uveden objem pro jeden z primerového páru, objem druhého primeru je totožný), podmínky PCR a celkový objem reakce pro jeden vzorek.

Teplota annealingu pro multiplex 1 je 57°C při 33 cyklech, annealingová teplota pro multiplex 2 je 60°C při 33 cyklech polymerázové řetězové reakce.

Tabulka 13 obsahuje nukleotidové sekvence primerů, údaj o jednotkové repetici a odkaz na výchozí zdroj.

Tabulka 13 Nukleotidové sekvence markerů začleněných do multiplexů - jedle bělokorá

<b>Multiplex 1</b>						
<b>Autor</b>	<b>Lokus</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>	<b>Repetice</b>	<b>Bp</b>	
Postolache et al. (2014)	<b>Aat01</b>	CCATGTCTCCGATTTCCAGT	GGCCTAACGAAAGCAGAATC	GCG	103 - 127	
	<b>Aat02</b>	AGAAGATTTCCCGGCTTTTC	ATCCAGACAGCGAACTTTGG	CAG	123 - 129	
	<b>Aat03</b>	TCCCATGGTTTGGTTAAAA	CGAAGAAAATGTTGCGGAAT	AT	149-161	
	<b>Aat05</b>	AGCATCCACATTCCGTAACC	AGTTGACCGTTGGAGAGCAG	CAG	177-192	
	<b>Aat06</b>	TTATGCGGAGCATTCTGTG	TGTTGCTGGCGTACTGGTAG	GCA	196-214	
	<b>Aat08</b>	ACTCCATCACGGTGGTCTTC	GCCATTGAGGCTCTCAGTTC	AT	302-312	
	<b>Aat09</b>	CAGATCCTCCACATCCAAC	TGACACCACAGGAAACCATC	TCA	150-156	
	<b>Aat11</b>	AGCGTTGATTGGAAGCAGTC	GAAGCATGGTGTCTGTTG	AAC	255-270	
	<b>Aat13</b>	ACTCAAAGCCAAGCTGGAGA	TGCATAAGACAGCCGAGTCA	AG	326-342	
	<b>Aat14</b>	GACTGGGGATCCTGCTGTTA	AGAGGAGGCAGCCATACAT	TA	358-394	
	<b>Aat16</b>	AACCACCGCTGATATTTGG	GGGTTCAGAAATGGGAATG	GAA	427-430	
	<b>Aag01</b>	GCTTATTCTCACTGCTCGCC	ATGACTGAAGGTGGATGCC	CTT	193-250	
	<b>Aag02</b>	TATTCCTCCACTGGGTGCT	GGTGGAGATCCGTATGCAAT	GA	208-250	
	Cremer et al.(2006)	<b>SFb5</b>	FAM-AAAAAGCATCACTTTTCTCG	AAGAGGAGGGGAGTTACAAG	CT	143 - 155
		<b>SFg6</b>	GTAACAATAAAAGGAAGTACG	TGTGACACATTGGACACC	AC	107 - 113
		<b>SF324</b>	TTGAACGGAAATCAAATTC	AAGAACGACACCACTTCAC	CCG	110 - 116
<b>Multiplex 2</b>						
<b>Autor</b>	<b>Lokus</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>	<b>Repetice</b>	<b>Bp</b>	
Hansen et. al., (2005)	<b>NFH3</b>	TTGCCATCAAATTA AAATGCTT	CATCATTCTCTATCCCCATCA	AAC	93 - 133	
	<b>NFF3</b>	CCAATGGGTTGTCAGAGTGTT	GGCATTGAGATTGCTTGAT	AT	107 - 143	
Postolache et al. (2014)	<b>Aat04</b>	CCATGTATGGTGCTCCTCT	CCTTCATTGCAGAAAAGCAA	CAG	158-191	
	<b>Aat07</b>	GCTAGCAGAACCCTGGAATG	GGTGGGATATTTCCAGCAAG	AT	219-241	
	<b>Aat10</b>	GAGCACGATGAAGAGGAAGC	AAAACCCACGCGGTAT	AT	226-250	
	<b>Aat12</b>	ATCCATATCTCTGCCTTGC	CTTCCAGGTGATCTGATTGC	AG	303-349	
Cremer et al.(2006)	<b>Aat15</b>	AGGAGGAGGTTGAGCATGTC	CTTGCTCTGACCCAGTTG	AGA	361-373	
	<b>SF b4</b>	GCCTTTGCAACATAATTGG	TCACAATTGTTATGTGTGTGG	GT	166 - 186	
	<b>SF 83</b>	AGCAGCATAACCAAGGGTCAA	TCTGAATTTCTAAAGCGGC	CTT	197 - 206	
	<b>SF01</b>	TTGACGTGATTAACAATCCA	AAGAACGACACCACTTCAC	CCG	221 - 226	

#### 4.6. Genetická struktura testovací populace jedle bělokoré

K analýze genetické variability jedle bělokoré bylo předem vytipováno celkem deset lokalit. Tyto lokality byly zvoleny zejména z důvodu předpokládané autochtonnosti porostů. Tento předpoklad se zakládal na dokumentaci o původu porostů. Dalším předpokladem pro zvolení konkrétních populací bylo jejich rozmístění na území České republiky. Pro zachycení genetické variability jedle bělokoré jako druhu na území České republiky bylo vhodné, aby byly populace určené k analýze rozmístěny na co nejširším území. Základní soubor testovací populace tvoří 10 jedinců z každé z deseti lokalit. Počet sto jedinců je pro genetickou analýzu generalizující oblast celé České republiky statisticky nedostatečný. Testovací populace však byla analyzována především za účelem demonstrace diskriminační síly vytvořeného markeru, nikoliv jako rigorózní studie genetické diverzity.

Tabulka 14 se sumární statistikou obsahuje ukazatel počtu alel detekovaných na konkrétním lokusu ( $k$ ),  $H_{obs}$  je pozorovaná heterozygotnost,  $H_{exp}$  je očekávaná heterozygotnost, PIC *polymorphic information content* je ukazatelem míry informativní hodnoty lokusu, HW je odchylka od Hardyho-Weinbergovy rovnováhy (ND= analýza nemohla proběhnout, NS= odchylka se nevyskytla, \*\*\*= odchylka se vyskytla) a F (Null) je hodnota ukazatele potenciálního výskytu nulových alel. Informativně vysoce hodnotné jsou především mikrosatelitové markery AaG02, SFb4 a NFH3. Tyto lokusy vykazují vysokou míru detekovaných alel, minimální rozdíl mezi očekávanou a pozorovanou heterozygotností, údaj PIC, který ukazuje jakou sílu má lokus ve vylišování variability, se blíží hodnotě 1, tedy jeho vliv na detekci polymorfismu je značný. Je však důležité zdůraznit, že i samostatně méně informativní lokus přiřazený do souboru současně generovaných dat významně navyšuje informativní hodnotu.

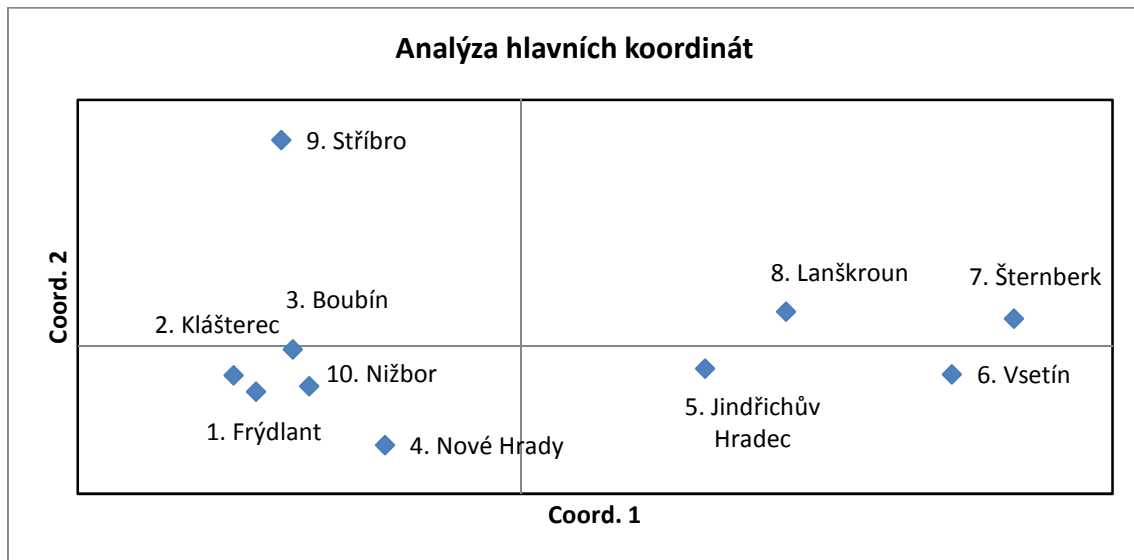


Tabulka 14 Souhrnná charakteristika parametrů polymorfismu – jedle bělokorá

	Locus	k	HObs	HExp	PIC	HW	F(null)
M1	Aat1	4	0,432	0,471	0,392	***	0,1111
	SFb5	8	0,707	0,754	0,708	***	0,0874
	AaG02	11	0,606	0,844	0,82	***	0,1783
	Aat2	2	0,442	0,498	0,373	***	0,1623
	Aat5	3	0,114	0,154	0,144	ND	0,1847
	Aat11	3	0,621	0,569	0,473	***	0,1429
	Aat14	8	0,348	0,643	0,593	***	0,4126
	SFg6	8	0,217	0,691	0,659	***	0,5301
	Aat6	3	0,032	0,031	0,031	***	0,8558
	Aat8	4	0,211	0,546	0,479	***	0,5989
	SF324	7	0,776	0,723	0,668	***	0,0386
	Aat03	5	0,57	0,578	0,497	***	0,1141
	AaG01	10	0,611	0,629	0,591	NS	0,0456
	Aat16	2	0,337	0,334	0,277	**	0,1816
	M2	Aat4	7	0,537	0,555	0,503	*
Aat10		5	0,921	0,791	0,752	NS	-0,0218
NFF3		10	0,726	0,8	0,766	NS	0,0726
SF01		4	0,432	0,462	0,387	***	0,1293
SFb4		18	0,565	0,914	0,902	ND	0,2743
Aat15		3	0,326	0,317	0,269	***	0,2335
NFH3		17	0,621	0,834	0,807	ND	0,1422
Aat7		9	0,716	0,773	0,73	***	0,299
Aat12		6	0,733	0,749	0,705	***	0,044

#### 4.7. Prostorová populačně-genetická analýza

Mikrosatelitová data testovací populace byla analyzována z hlediska populační struktury. Byl generován grafický výstup s využitím software GenAlEx 6.5 (<http://biology-assets.anu.edu.au/GenAlEx/Welcome.html>). Byla provedena analýza hlavních koordinát (PCoA, obr. 24), jde o metodu, která snižuje dimenzionalitu dat pro účely grafického zobrazení.



Obrázek 24 Analýza hlavních koordinát (PCoA) – jedle bělokorá

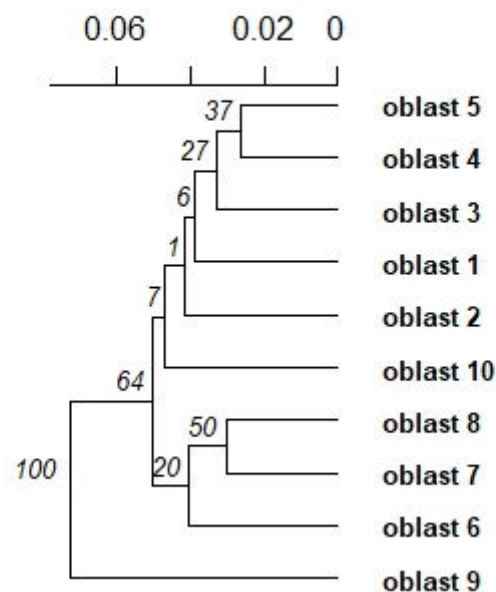
V analýze hlavních koordinát (obr. 24) vysvětluje první osa 32,10% variability, druhá osa vysvětluje 20,25% variability a třetí osa vysvětluje 14,56% variability. Z bodového grafu je patrné, že na základě genetické vzdálenosti jsou rozděleny analýzou hlavních koordinát do čtyř kvadrantů s následujícím zastoupením populací:

1. Kvadrant – Populace 9,
2. Kvadrant – Populace 7, 8,
3. Kvadrant – Populace 1,2,3,4, 10,
4. Kvadrant – Populace 5,6.

Závěry analogické k závěrům PCoA byly získány i z dendrogramu metodou rozkládání na základě podobností genetické příbuznosti, která je vyobrazena na grafu

UPGMA vytvořeném za pomoci programu R (obr. 25) na základě matice genetických vzdáleností vycházející z údajů o alelových frekvencích. Dendrogram vychází z klastrové analýzy (*Cluster Analysis*), která je vhodnou metodou pro zhodnocení vícerozměrných dat a nalezení skupin uvnitř datového souboru.

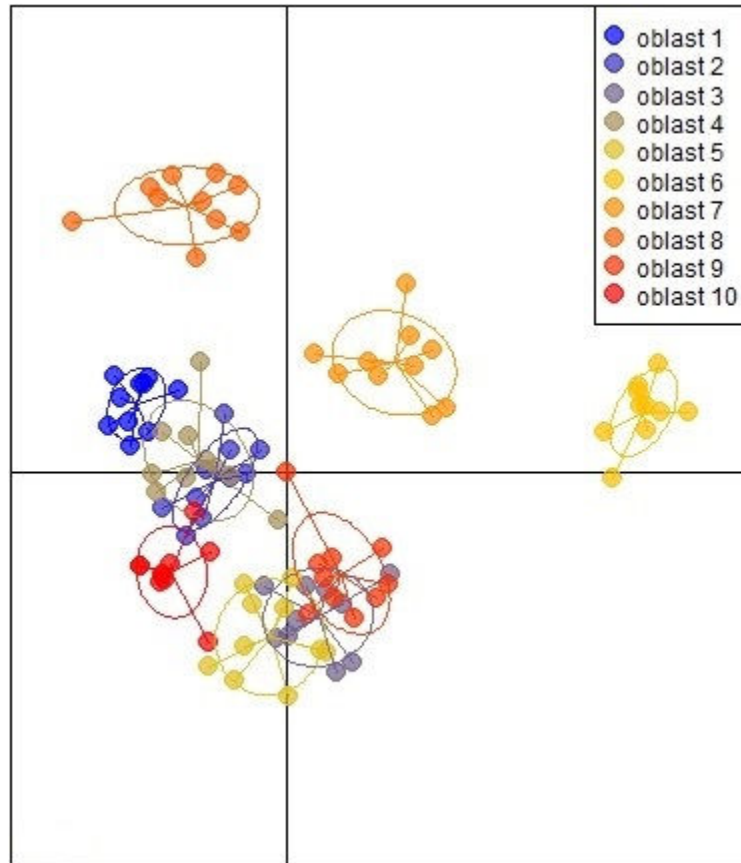
V diagramu lze pozorovat dva hlavní shluky populací, přičemž jeden zahrnuje populace 8 (LS Lanškroun), 7 (LS Šterneberk), 6 (LS Vsetín) a 9 (LS Stříbro) a druhý zahrnuje populace 5 (LS Jindřichův Hradec), 4 (LS Nové Hrady), 3 (LS Boubín), 1 (LS Frýdlant), 2 (LS Klášterec) a 10 (LS Nižbor). Populace 9 (LS Stříbro) se stejně jako v předchozí PCoA analýze jeví jako geograficky nejvzdálenější



Obrázek 25 Dendrogram UPGMA – jedle bělokorá

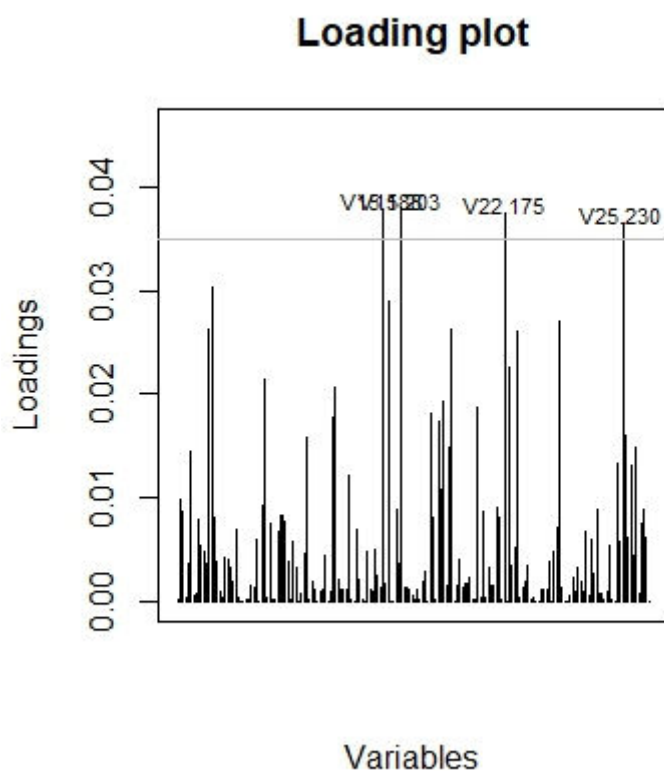
Další graf je obdobou analýzy PCoA i dendrogramu UPGMA. Grafický výstup (obr. 26) vytvořený za pomoci programu R využívá metodu diskriminační analýzy hlavních komponent - DAPC (JOMBART ET AL., 2010). Jde o multivarietní metodu klastrování geneticky příbuzných jedinců, kdy jsou data pro redukci dimenzionality nejprve transformována pomocí analýzy hlavních komponent (PCA) a následně je provedena diskriminační analýza (DA). Z grafu je patrné, že nejvíce se překrývají oblasti 1 (LS Frýdlant), 2 (LS Klášterec), 4 (LS Nové Hrady) a 10 (LS Nižbor). Další překryv nastává mezi populacemi 5 (LS Jindřichův Hradec), 3 (LS Boubín) a 9

(LS Stříbro). Geneticky vzdálenější populace se jeví populace 8 (LS Lanškroun), 7 (LS Šternberk) a 6 (LS Vsetín).



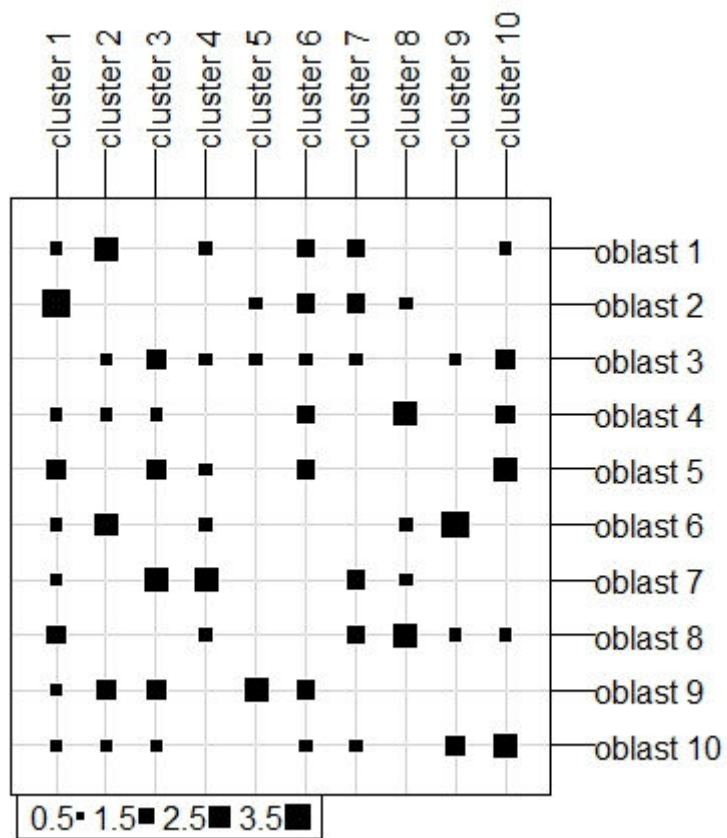
Obrázek 26 Graf DAPC – jedle bělokorá

Obrázek 27 znázorňuje míru vlivu jednotlivých lokusů na rozklastrování podle jejich detekované genetické variability. Největší podíl na rozklastrování má lokus č. 15 (AaG01) s délkou alely 158 bp, lokus č. 18 (SF83) s alelou o délce 203 bp, lokus č. 22 (SFb4) s alelou o délce 175 bp a lokus č. 25 (Aat7) s alelou o délce 230 bp.



Obrázek 27 Vliv jednotlivých lokusů na rozkládání – jedle bělokorá

Grafický výstup (obr. 28) vylišuje příbuzenské clustery studovaných skupin jedinců. Výchozí hypotézou je tvrzení, že každá vzorkovaná populace je samostatnou genetickou skupinou, což vytváří schéma 10 clusterů x 10 populací. Velikost a počet černých čtverečků pak prezentuje skutečnou diferenciaci genetické diverzity jedinců každé populace. Tato genetická vzdálenost je graficky vyobrazena právě na zmíněném obrázku 28. Populace patřící do oblasti 6 je nejvíce geneticky blízká clusterům 9, 2, 1, 4 a 8. Do clusteru 10 se řadí populace z oblastí 1, 3, 4, 5, 10 a 8.



Obrázek 28 Distribuce genetické variability do 10 klastérů – jedle bělokorá

## 5. Smrk ztepilý

### 5.1. Charakteristika smrku ztepilého (*Picea abies* [L.] Karst.)

Smrk ztepilý (*Picea abies* [L.] Karst.) patří ve střední a severní Evropě z hlediska hospodářského, ekonomického a ekologického mezi nejdůležitější využívané dřeviny. Smrk ztepilý produkuje vysoce kvalitní dřevo s dlouhými vlákny, které je žádanou komoditou v dřevozpracujícím a papírenském průmyslu.

Na území České republiky mají lesní porosty výrazně pozměněnou druhovou skladbu. Je možno předpokládat že přibližně 90 % lesních porostů je geneticky nepůvodních (Vančura, 1995). Smrk ztepilý je v České republice už po desetiletí považován za hlavní hospodářskou dřevinu. Jeho přirozené plošné zastoupení je odhadováno na 11,2 % (Pospíšil et Koblíha, 1988; Musil et al., 2001). Před 15 lety bylo zastoupení okolo 54 % (Musil et al., 2001). Podle nejnovějších údajů je současné zastoupení 51,1%. (Zelená zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství 2015, 2016). Ještě nižší hodnoty vykazuje průzkum z národní inventarizace lesa z let 2001 - 2004 (NIL, 2007) v první vlně a v druhé vlně o deset let později tedy 2011- 2015 (NIL2, 2016). Výsledky z let 2001 - 2004 vyhodnocují plošné zastoupení smrku na 47,7% (1 138 424 ha). Oproti tomu inventarizace z let 2011 - 2016 odhadla plošné zastoupení smrku ztepilého v České republice v kategorii les na 44,1 %. Stejně tak se v čase mění střední plošný věk. U smrku ztepilého se od roku 2010 ustálil na 63 letech. Od roku 1980, kdy průměrný plošný věk dosahoval 58 let, se tedy zvýšil o 5 let. Je zde jasně patrný trend, při kterém se plošné zastoupení smrku postupně snižuje. Na základě ekologické únosnosti a dle společenských potřeb je stanoveno doporučené zastoupení na 36,5 % (Musil et al., 2001).

Nejběžnější variantou v našem lesnictví je zastoupení smrku v podobě smrkových monokultur, které jsou ekonomicky výhodné při zpracování produkce (Schubert et al., 2001). Oproti tomu jsou monokulturální lesy více náchylné k abiotickým a biotickým škodlivým vlivům a je nutné zajistit řádné pěstební opatření (Holuša et Liška, 2002). V České republice je smrk ztepilý rozšířen od nejvýše položených míst, jako je Sněžka (výskyt do 1550 m.n.m.), až po nížinné oblasti, jako jsou Labské pískovce (117 m.n.m.). Smrk nalezneme ve většině nižších i vyšších pohoří (300 - 1350 m). Těžištěm výskytu jsou ovšem okrajová příhraniční pohoří. Přirozeně se smrk ztepilý vyskytoval pouze okrajově na Českomoravské a Dražanské vrchovině, v Brdech, Slavkovském lese a Oderských vrších, a to především v podobě

vnitrozemských horských skupin (Musil et al., 2001). Velmi aktuální je problematika chřadnutí smrkových porostů v důsledku klimatických změn a následného působení sekundárních škodlivých činitelů.

## 5.2. Genom smrku ztepilého

Genom je definován jako souhrn všech genů u všech chromozómů v jádře buňky (Acheré et al., 2005). První zmapovaný druh z řady jehličnatých je popsán právě smrk ztepilý s předpokládanou velikostí 19,6 miliard párů nukleotidů - Gbp (Nystedt et al., 2013). Pro relevantní data byly použity části kódující i nekódují frakce genomu smrku ztepilého, které se dále porovnávaly a odhadovaly od příbuzných druhů, kterými byly borovice lesní (*Pinus sylvestris*), jedle sibiřská (*Abies sibirica*), jalovec chvojka (*Juniperus communis*) a tis červený (*Taxus baccata*). Genetická komparativní studie smrku ztepilého poskytla cenné informace a náhled do evolučního vývoje jehličnatých dřevin. Znalost genomu jehličnanů umožňuje porovnávací analýzy genomové architektury a pochopení evoluce jehličnatých dřevin. Poznání genomu je dále zásadní z hlediska designování a vývoje genetických markerů (Nystedt et al., 2013).



### 5.3. Vlastní výběr mikrosatelitových markerů

Na základě rozboru dostupných zdrojů a posouzení kvality amplifikace a míry vylišovaného polymorfismu bylo předselektováno 68 párů smrkových mikrosatelitových primerů. Tyto vybrané primerové páry byly nasyntetizovány (tab. 15). Funkčnost a polymorfismus markerů byl ověřován na testovací populaci smrku ztepilého. Z těchto primerů byl vyselektován užší výběr, který se na základě literatury osvědčil nejlépe, a tyto primery byly objednány v neznačeném stavu (tj. neobarvené fluorescenčním markerem) u firmy Geneti biotech. Při výběru primerů byly zohledňovány poznatky metodiky. U užšího výběru primerů byl testován jejich polymorfismus pomocí gelové elektroforézy s polyakrylamidovým separačním prostředím a dle tohoto kritéria bylo vybráno 18 primerů vykazujících vysoký podíl polymorfismu. Kritériem výběru byla kromě míry polymorfismu také efektivita amplifikace. Bylo vybráno i několik primerů s nižší úrovní polymorfismu s cílem otestovat vzorky na co možná nejširším spektru lokusů. Tabulka 78 nacházející se v přílohách obsahuje číselné značení jedinců, číslo přírodní lesní oblasti, název lesní správy a upřesňující název lokality pro snadnější identifikaci místa odběru.

### 5.4. Seznam testovaných mikrosatelitových markerů

Tabulka 15 Seznam testovaných markerů pro smrk ztepilý

ID	Autor, rok	Název lokusu	ID	Autor, rok	Název lokusu
1	Vendramin et al., 1996	<b>Pt63718</b>	35	Scotti et al., 2002b	<b>EAC6B11</b>
2		<b>Pt71936</b>	36		<b>EAC6C02</b>
3	Pfeiffer et al., 1997	<b>SpAG2</b>	37		<b>EAC6D01</b>
4		<b>SpAGC1</b>	38		<b>EAC7F10</b>
5		<b>SpAGC2</b>	39		<b>EAC7G08</b>
6		<b>SpAGD1</b>	40		<b>EAC2C08</b>
7		<b>SpAGG3</b>	41	Besnard et al., 2003	<b>prGB1</b>
8		<b>SpAC1F7</b>	42		<b>paGB3</b>
9		<b>SpAC1H8</b>	43		<b>pgGB5</b>
10	Scotti et al., 2000	<b>PAAC3</b>	44		<b>pgGB7</b>

11		<b>PAAC13</b>	45		<b>paGB8</b>
12		<b>PAAC19</b>	46		<b>pgGB11</b>
13		<b>PAAC23</b>	47		<b>pgGB16</b>
14		<b>PAAC3</b>	48	Rungis et al., 2004	<b>WS0015.I04</b>
15	Scotti et al.,2002a	<b>EATC1A02</b>	49		<b>WS0019.F22</b>
16		<b>EATC1A07</b>	50		<b>WS0022.B15</b>
17		<b>EATC1B02</b>	51		<b>WS0032.M17</b>
18		<b>EATC1E03</b>	52		<b>WS0053.K16</b>
19		<b>EATC1C01A</b>	53		<b>WS0073.H08</b>
20		<b>EATC1C09</b>	54		<b>WS0092.A19</b>
21		<b>EATC1C10A</b>	55		<b>WS00716.F13</b>
22		<b>EATC1D02A</b>	56		<b>WS0023.B03</b>
23		<b>EATC1F07B</b>	57	Fluch 2011	<b>Pa_28</b>
24		<b>EATC1F09</b>	58		<b>Pa_33</b>
25		<b>EATC2B02</b>	59		<b>Pa_52</b>
26		<b>EATC2C01</b>	60		<b>Pa_56</b>
27		<b>EATC3C05</b>	61	Shi et al., 2014	<b>RPMSA22</b>
28		<b>EATC3H03</b>	62		<b>RPMSA06</b>
29		<b>EATC1C10B</b>	63		<b>RPMSA17</b>
30	Scotti et al., 2002b	<b>EAC7H07</b>	64		<b>RPMSA07</b>
31		<b>EAC1A07</b>	65		<b>RPMSA11</b>
32		<b>EAC1C08</b>	66		<b>RPMSA13</b>
33		<b>EAC1F04</b>	67		<b>RPMSA27</b>
34		<b>EAC6A02</b>	68		<b>RPMSA33</b>

Vybrané sekvence mikrosatelitových primerů (tabulka 15) byly dodány společností zabývající se výrobou oligonukleotidů. Po přípravě pracovního roztoku lze uskutečnit jednotlivé kroky směřující k sestavení multiplexu (PCR, ověření amplifikace a polymorfismu separačními technikami). Amplifikující se markery jsou pak dále testovány a shlukovány do multiplexů. Multiplex musí splňovat kritéria odlišné délky amplifikovaných fragmentů naznačených stejnou fluorescenční barvou, primerové páry nesmí vytvářet v reakční směsi dimery a musí se shodovat podmínky PCR reakce, tedy především teplota annealingu. Výsledkem celého procesu je soubor 18 mikrosatelitových párů, které byly sdruženy do 2 multiplexů M1 a M2.

## 5.5. Vytvořené multiplexy M1 a M2 pro smrk ztepilý

Tabulka 16 Protokol smrku ztepilého pro multiplexy M1 a M2

Multiplex 1		délka (bp)	objem	PCR program	Reakce
1	paGB3	113-131	0,200 ul	1x 95°C 15min	DNA 1 ul
2	WS0022.B15	176-212	0,500 ul	95°C 30s	primery 5,34 ul
3	SpAGD1	126-172	0,500 ul	40x 60°C 45s	H <sub>2</sub> O 0,46 ul
4	SpAG2	84-115	0,120 ul	72°C 30s	Type-It 6,8 ul
5	EATC1E03	129-139	0,100 ul	1x 60°C 30min	
6	WS00716.F13	209-245	1,040 ul	1x 4°C ∞	
7	Pt71936 *	138-148	0,025 ul		celkem 13,6 ul
8	Pt63718 *	100-102	0,035 ul		
9	EATC1D02A	185-237	0,150 ul		
			2,670 ul		
*) chloroplastové lokusy					
Multiplex 2		délka (bp)	objem	PCR program	Reakce
1	WS0073.H08	199-217	0,075 ul		
2	Pa_28	153-173	0,060 ul	1x 95°C 5min	DNA 1 ul
3	PAAC23	273-313	0,075 ul	95°C 45s	primery 3,27 ul
4	WS0092.A19	215-235	0,300 ul	35x 59°C 60s	H <sub>2</sub> O 0,43 ul
5	WS0023.B03	171-203	0,150 ul	72°C 45s	Type-It 4,7 ul
6	Pa_33	100-106	0,225 ul	1x 72°C 30min	
7	WS0019.F22	363-369	0,150 ul	1x 4°C ∞	
8	WS0015.I04	123-140	0,300 ul		celkem 9,4 ul
9	PAAC3	240-314	0,300 ul		
			1,635 ul		

**Pozn.** Uvedený protokol je platný pro koncentraci DNA 20 ng/ul a koncentraci primerů 10mM

Tabulka 16 obsahuje jeden ze stežejných dílčích výstupů, a to sestavené a otestované multiplexy pro analýzu genetické struktury smrku ztepilého. Sestavené multiplexy byly testovány na vybraných populacích smrku ztepilého na území České republiky. Multiplexy jsou konečným výsledkem testování výchozích 68 primerových párů.

Každý ze dvou multiplexů obsahuje 9 primerových párů, celkem je tedy generována informace o 18 mikrosatelitových lokusech. Dva lokusy (Pt71936 a Pt63718) jsou chloroplastovými markery s uniparentálním charakterem přenosu genetické informace. Oligonukleotidové sekvence vybraných primerů jsou uvedeny v tabulce 17.

Barevné označení u názvu lokusu odpovídá barvě fluorescenčního značení primeru. Dále je uveden délkový rozsah ampliconů pozorovaný v testovací populaci, objem pracovní koncentrace primerů (je uveden objem pro jeden z primerového páru, objem druhého primeru je totožný), podmínky PCR a celkový objem reakce pro jeden vzorek.

Teplota annealingu pro multiplex 1 je 59°C při 40 cyklech, annealingová teplota pro multiplex 2 je 60°C při 35 cyklech polymerázové řetězové reakce.

Tabulka 17 Nukleotidové sekvence markerů začleněných do multiplexů – smrk ztepilý

<b>Multiplex SM 1</b>					
<b>Autor</b>	<b>Název</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>	<b>Repetice</b>	<b>Bp</b>
Besnard et al. 2003	<b>paGB3</b>	AGTGATTAAGCTCTGACCAC	CACTGAATACACCCATTATCC	AT	117 - 153
Rungis et al. 2004	<b>WS0022.B15</b>	TTTGTAGGTGCTGCAGAGAT G	TGGCTTTTATTCCAGCAAGA	AG	169 - 207
	<b>WS00716.F13</b>	TCAAGTAATGGACAAACGAT ACA	TTTCCAATAGAATGGTGGATTT	GA	281 - 307
Pfeiffer et al. 1997	<b>SpAGD1</b>	GTCAACCAACTGTAAAGCCA	ACTTGTGGCATTTC	AG	147 - 164
	<b>SpAG2</b>	GCTCTTCACGTGTACTTGATC	TTCCAAGATCCTCAAGATAC	TC	96 - 114
Scotti et al. 2002b	<b>EATC1E03</b>	CCOCTTATTCCTAAOGTCAAA	TACCAAGTGGTGACAACGATG	AC	175
	<b>EATC1D02A</b>	TTGTATCGTCGTCATTGTC	TTTTAGCCTCTGTTTCTAGCG	TCA	200 - 250
Vendramin et al. 1996	<b>Pt63718</b>	CACAAAAGGATTTTTTTCAG TG	CGACGTGAGTAAGAATGGTTG	T	92
	<b>Pt71936</b>	TTCATTGGAAATACACTAGCC C	AAAACCGTACATGAGATTCCC	T	146
<b>Multiplex SM 2</b>					
<b>Autor</b>	<b>Název</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>	<b>Repetice</b>	<b>Bp</b>
Fluch et al. 2011	<b>Pa_28</b>	GGCCGAAAGTGCTACTGCTA	TGCTCCAGAAGAACAACACTCACA	TCG	145 - 170
	<b>Pa_33</b>	GGTCGAGGAGGAGGAGGTA G	CACCGCTAGTGCAGTCTCTG	CGG	90 - 110
Scotti 2000	<b>PAAC23</b>	TGTGGCCCCACTTACTAATAT CAG	CGGGCATTGGTTTACAAGAGTTGC	GT	300
	<b>PAAC3</b>	CGCTACCTCAGATTTCTCCA	AGATATTCCTCACAAAGTTGG	CA	260
Rungis 2004	<b>WS0073.H08</b>	GGGATGCCTGGGTAATAAAA A	TTTTGCATTTGCTTTGATATGTG	GCAG	200 - 210
	<b>WS0092.A19</b>	TGTGGTTTTCTGCTTGAAA	CCCATTTGACTTTGAAATAAGC	AC	103
	<b>WS0023.B03</b>	AGCAGCTGGGGTCAAAGTT	AAAGAAAGCATGCATATGACTCAG	AT	90 - 105
	<b>WS0019.F22</b>	AAGCGTTTCTATTTCCTTGG	GGGCCAGAACTAACAATGA	AT	350 - 400
	<b>WS0015.I04</b>	CACCCTTAACCAAGCAAGC	GGTCTACATGTTTATCACCAACGA	AT	120 - 140

## 5.6. Genetická struktura testovací populace smrku ztepilého

Základní soubor testovací populace tvoří 10 jedinců z každé z deseti lokalit. Pro oblast LS Prostějov bylo analyzováno 20 jedinců. Celkem bylo analyzováno 110 jedinců. Pro stromy s číselným označením 21 – 30 byla ověřována amplifikace pro dva typy výchozího pletiva (jehlice a vrstva dřeva s kambiem). Uvedený počet jedinců je pro genetickou analýzu generalizující oblast celé České republiky statisticky nedostatečný. Testovací populace však byla analyzována především za účelem demonstrace diskriminační síly vytvořeného markeru, nikoliv jako rigorózní studie genetické diverzity.

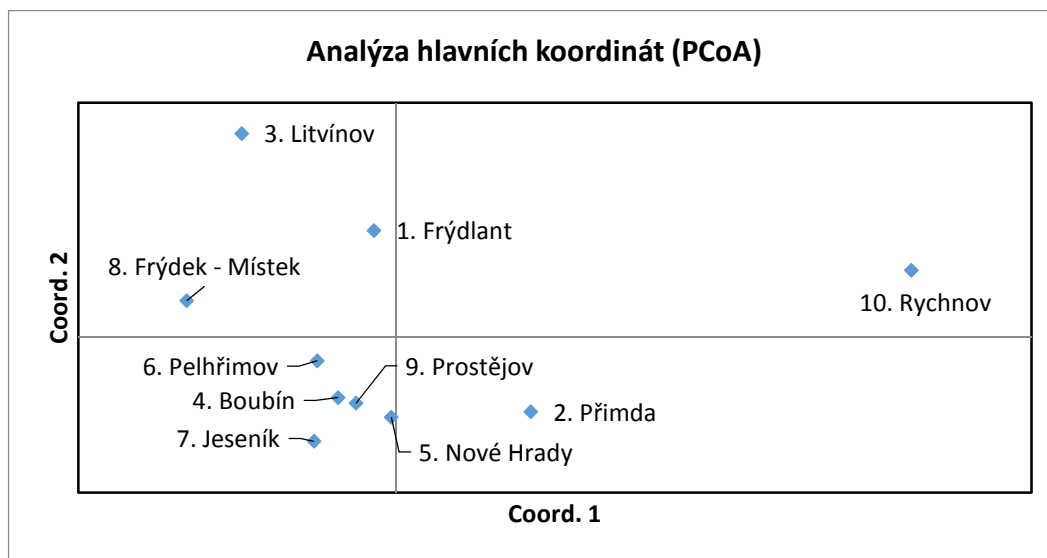
Tabulka 18 se sumární statistikou obsahuje ukazatel počtu alel detekovaných na konkrétním lokusu ( $k$ ), Hobs je pozorovaná heterozygotnost, Hexp je očekávaná heterozygotnost, PIC polymorphic information content je ukazatelem míry informativní hodnoty lokusu, HW je odchylka od Hardyho-Weinbergovy rovnováhy (ND= analýza nemohla proběhnout, NS= odchylka se nevyskytla, \*\*\*= odchylka se vyskytla) a F (Null) je hodnota ukazatele potenciálního výskytu nulových alel. Informativně vysoce hodnotné jsou především mikrosatelitové markery WS00716.F13, WS0022.B15, SpAG2 WS0023.B03 a PAAC3. Tyto lokusy vykazují vysokou míru detekovaných alel, minimální rozdíl mezi očekávanou a pozorovanou heterozygotností, údaj PIC, který ukazuje jakou sílu má lokus ve vylíšování variability, se blíží hodnotě 1, tedy jeho vliv na detekci polymorfismu je značný. Je však důležité zdůraznit, že i samostatně méně informativní lokus přiřazený do souboru současně generovaných dat významně navyšuje informativní hodnotu.

Tabulka 18 Souhrnná charakteristika parametrů polymorfismu – smrk ztepilý

	Lokus	k	HObs	HExp	PIC	HW	F(Null)
M1	EATC1D02A	20	0.563	0.805	0.785	NS	0.1646
	EATC1E03	5	0.306	0.392	0.361	NS	0.1178
	paGB3	7	0.515	0.746	0.708	***	0.1931
	Pt71936	5	0.010	0.109	0.106	ND	0.6692
	Pt63718	2	0.000	0.355	0.291	***	0.9924
	SpAG2	16	0.586	0.900	0.886	ND	0.2079
	SpAGD1	24	0.837	0.777	0.761	***	-0.0855
	WS0022.B15	19	0.806	0.856	0.842	NS	0.0299
	WS00716.F13	21	0.442	0.924	0.914	ND	0.3535
	M2	PA 33	4	0.193	0.206	0.188	ND
WS0019.F22		4	0.453	0.593	0.533	NS	0.1362
PA 28		12	0.657	0.739	0.699	NS	0.0538
WS0073.H08		8	0.591	0.683	0.621	NS	0.0721
PAAC23		13	0.694	0.666	0.642	NS	-0.0260
WS0023.B03		15	0.322	0.916	0.904	ND	0.4763
WS0092.A19		11	0.813	0.817	0.793	NS	0.0046
WS0015.I04		6	0.688	0.622	0.556	NS	-0.0606
PAAC3		29	0.592	0.918	0.907	ND	0.2101

## 5.7. Prostorová populačně-genetická analýza

Mikrosatelitová data testovací populace byla analyzována z hlediska populační struktury. Byl generován grafický výstup s využitím software GenAlEx 6.5 (<http://biology-assets.anu.edu.au/GenAlEx/Welcome.html>). Byla provedena analýza hlavních koordinát (PCoA, obr. 29), jde o metodu, která snižuje dimenzionalitu dat pro účely grafického zobrazení.



Obrázek 29 Analýza hlavních koordinát (PCoA) – smrč ztepilý

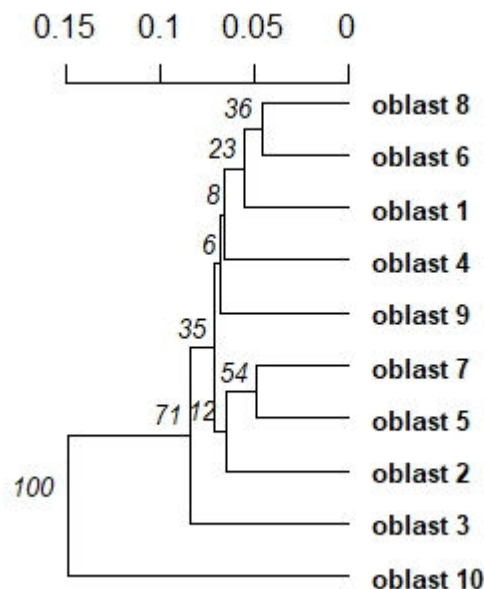
V analýze hlavních koordinát (obrázek 29) vysvětluje první kvadrant menší genetickou variabilitu mezi populacemi 3 (LS Litvínov), 8 (LS Frýdek - Místek) a 1 (LS Frýdlant), i přesto je tu však jasně patrný dopad geografické vzdálenosti. V rozmezí hranic druhého kvadrantu se nachází populace 10 (LS Rychnov), které svou izolovaností kopírují geografickou vzdálenost. Třetí kvadrant obsahuje populace 6 (LS Pelhřimov), 4 (LS Boubín), 7 (LS Jeseník), 5 (LS Nové Hradky) a 9 (LS Prostějov), které jsou navzájem nejvíce geneticky ovlivněné v závislosti na geografickou blízkost. V posledním čtvrtém kvadrantu je vylíšena populace 2 (LS Přimda), která stejně jako první kvadrant odráží jak genetickou tak geografickou vzdálenost.

Z bodového grafu je patrné, že toto rozdělení probíhá na základě genetické vzdálenosti analýzou hlavních koordinát PCoA, kde jsou populace rozděleny do čtyř kvadrantů s následujícím zastoupením populací:

1. Kvadrant – Populace 1, 3, 8,
2. Kvadrant – Populace 10,
3. Kvadrant – Populace 4, 5, 6, 7, 9,
4. Kvadrant – Populace 2.

Závěry analogické k závěrům PCoA byly získány z dendrogramu metodou rozkládání na základě podobností genetické příbuznosti, která je vyobrazena na grafu UPGMA vytvořeném za pomoci nástroje adegenet v programu R (obrázek 30) na základě matice genetických vzdáleností vycházející z údajů o alelových frekvencích. Dendrogram vychází z klastrové analýzy (*Cluster Analysis*), která je vhodnou metodou pro zhodnocení vícerozměrných dat a nalezení skupin uvnitř datového souboru.

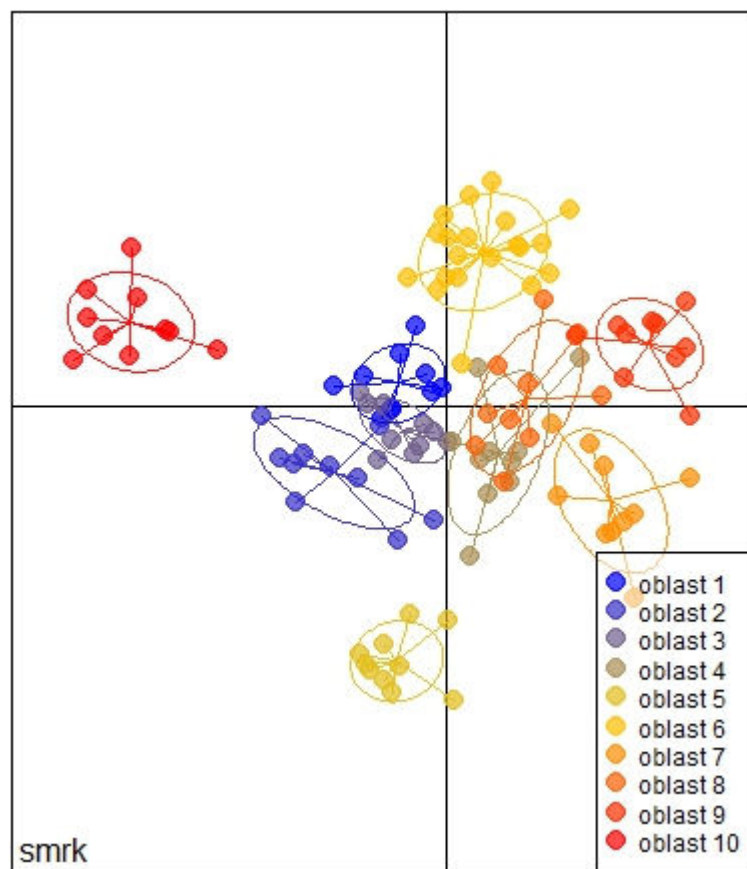
V diagramu lze pozorovat dva hlavní shluky populací, přičemž jeden zahrnuje populace 6 (LS Pelhřimov) a 8 (LS Frýdek – Místek, 1 (LS Frýdlant), 4 (LS Boubín) a 9 (LS Prostějov) a druhý shluk zahrnuje populace 7 (LS Jeseník) a 5 (LS Nové Hradky), 2 (LS Přimda), 3 (LS Litvínov) a 10 (LS Rychnov). Největší podobnost ukazují populace 8 a 6, následované ve shluku populacemi 7, 5.



Obrázek 30 Graf UPGMA – smrk ztepilý

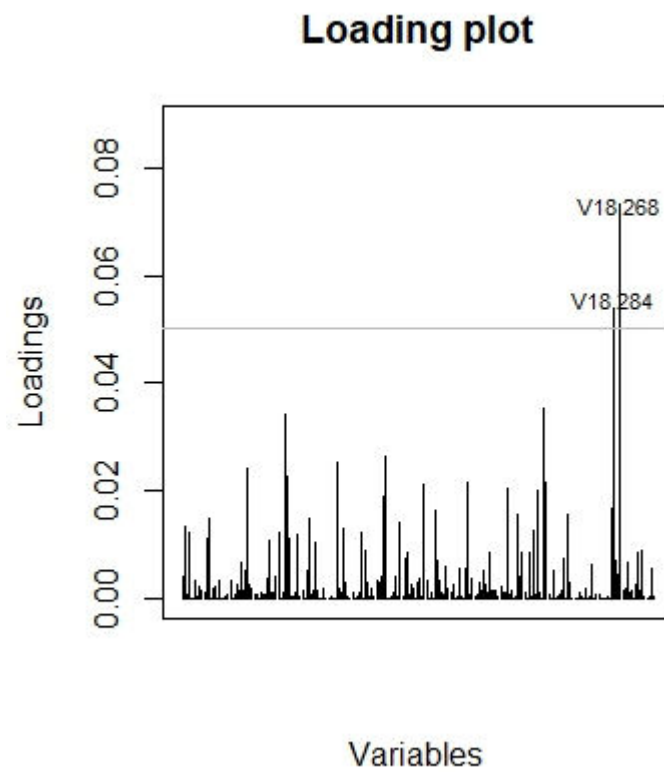


Další graf je obdobou analýzy PCoA i výše zmíněného dendrogramu UPGMA. Grafický výstup (obrázek 31) vytvořený za pomoci programu R využívá metodu diskriminační analýzy hlavních komponent - DAPC (JOMBART ET AL., 2010). Jde o multivarietní metodu klastrování geneticky příbuzných jedinců, kdy jsou data pro redukci dimenzionality nejprve transformována pomocí analýzy hlavních komponent (PCA) a následně je provedena diskriminační analýza (DA). Z grafu je patrné, že v největším překryvu – tedy geneticky nejpodobnější jsou oblasti 6 (LS Pelhřimov), 9 (LS Prostějov) a 8 (LS Frýdek Místek). Nejvzdálenější se jeví populace 10 (LS Rychnov).



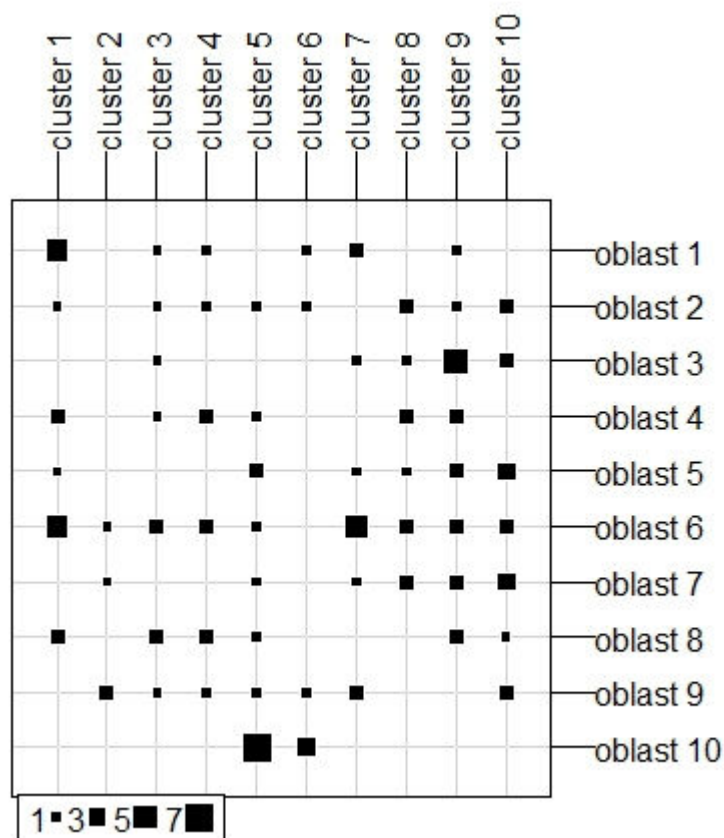
Obrázek 31 Graf DAPC – smrk ztepilý

Obrázek 32 znázorňuje míru vlivu jednotlivých lokusů na rozklastrování podle jejich detekované genetické variability. Největší podíl na rozklastrování má lokus č. 18 (PAAC3), a to konkrétně alely délek 268 a 284 bp.



Obrázek 32 Vliv jednotlivých lokusů na rozklastrování – smrk ztepilý

Grafický výstup (obr. 33) vylišuje příbuzenské clustery studovaných skupin jedinců. Výchozí hypotézou je tvrzení, že každá vzorkovaná populace je samostatnou genetickou skupinou, což vytváří schéma 10 clusterů x 10 populací. Velikost a počet černých čtverečků pak prezentuje skutečnou diferenciaci genetické diverzity jedinců každé populace. Tato genetická vzdálenost je graficky vyobrazena právě na zmíněném obrázku 33. Populace - oblast 10 se zároveň nejvíce geneticky blíží clusterům 5 a 6. Tento graf se dá uchopit i obráceně, kdy mezi nejpříbuznější u clusteru 6 se řadí jedinci z populací 1, 2, 9 a 10.



Obrázek 33 Distribuce genetické variability do 10 klasterů – smrk ztepilý

## C. Analýza potřeby ověřování původu

### 8. Manipulace s reprodukčním materiálem

#### 8.1. Reprodukční materiál

Reprodukčním materiálem se rozumí semenný materiál (šišky, semena, plody a plodenství), části rostlin (řízky, očka, hříženci, pruty, explantáty a jiné části rostlin) a sadební materiál (rostliny získané ze semenného materiálu, částí rostlin nebo vyzvednuté v lese z přirozeného zmlazení) (ÚHÚL, 2016).

Aby mohly být lesy trvale udržitelným zdrojem suroviny a mohly plnit i všechny ostatní funkce, musíme je po těžbě přirozeně nebo uměle obnovovat. Po mnoha chybách, ke kterým došlo v minulosti používáním geneticky a provenienčně nevhodného osiva pro umělou obnovu lesa na základě poznatků z genetiky, se začaly prosazovat snahy využívat jako zdroje osiva pouze kvalitní porosty (PALÁTOVÁ, 2007).

Kvalitní zdroj a vhodný původ reprodukčního materiálu je nejlevnějším a nejeefektivnějším prostředkem podpory kvality, vitality a stability lesních porostů. Dobrý genetický základ reprodukčního materiálu je navíc jednorázovým vkladem do produkčního cyklu lesa (LONGAUER, 2014).

Zdrojem reprodukčního materiálu se podle ZÁKONA č.149/2003 Sb. rozumí:

1. Zdroj semen, jímž je strom nebo skupina stromů rostoucí na pozemku určeném k plnění funkcí lesa, popřípadě i strom rostoucí mimo les, pro generativní způsob reprodukce.
2. Porost, jímž je ohraničená populace stromů má-li odpovídající stejnorodé složení, pro generativní i vegetativní způsob reprodukce.
3. Semenný sad, jímž je účelová výsadba selektovaných klonů nebo reprodukčního materiálu získaného z rodiče rodiny, který je izolován nebo obhospodařován tak, že sprášení pylem pocházejícím z rostlin nacházejících se mimo semenný sad je vyloučeno nebo omezeno, pro generativní způsob reprodukce.
4. Rodič rodiny, jímž je strom určený k produkci potomstva kontrolovaným nebo volným opylováním určeného jednoho samičího rodiče pylem jednoho samčího

rodiče nebo pylem více určených nebo neurčených samčích rodičů, pro generativní způsob reprodukce.

5. Klony, jimiž je skupina vegetativních potomků (ramety) získaná z jediného výchozího jedince (ortet) vegetativním množením, například řízkováním, mikrovegetativním množením, roubováním, hřížením nebo dělením.
6. Směs klonů, jíž je směs určených klonů se stanovenými podíly jednotlivých klonů pro vegetativní způsob reprodukce.
7. Ortet, jímž je strom určený k odběru částí rostlin pro vegetativní způsob reprodukce.

Genetickým zdrojem se rozumí jakýkoli materiál současné nebo potenciální hodnoty obsahující funkční jednotky dědičnosti. ZÁKON č. 149/2003 Sb. o obchodu s reprodukčním materiálem uvádí jako genetické zdroje:

- 1) Reprodukční materiál,
- 2) Zdroje reprodukčního materiálu,
- 3) Genové základny.

Genové základny, jsou soubor lesních porostů s významným podílem cenných regionálních populací lesních dřevin o rozloze, jež postačuje k udržení biologické různorodosti populace, která je při vhodném způsobu hospodaření schopna vlastní reprodukce (ZÁKON č.149/2003 Sb.).

Genové základny mohou být využity např. jako významné prvky v systému zvyšování stability lesů, mohou rozšiřovat a doplňovat soustavu přírodních rezervací vyhlášených rezortem ochrany přírody a krajiny, plnit funkce významné pro lesnický výzkum aj. Genové základny jsou vyhlášeny buď pouze pro jednu, nebo pro více druhů lesních dřevin. Většina genových základen byla vyhlášena pro hospodářsky významné druhy lesních dřevin; z hlediska zachování genetických zdrojů mají však význam i ostatní druhy dřevin, jejichž genofond je v souvislosti s tímto opatřením chráněn spíše samovolně (NOVOTNÝ, FRÝDL, ČÁP 2008). Uznávání zdroje reprodukčního materiálu se provádí u všech druhů dřevin. Uznávání zdroje identifikovaného, selektovaného a testovaného reprodukčního materiálu provádí pověřená osoba na základě žádosti vlastníka zdroje.

Zdroj reprodukčního materiálu se uznává na dobu určitou, stanovenou v dokladu nebo v rozhodnutí o uznání. Tato doba může být na žádost vlastníka zdroje rozhodnutím pověřenou osobou prodloužena, nejdéle o 12 měsíců. Uznávání zdroje identifikovaného, selektovaného, kvalifikovaného a testovaného reprodukčního materiálu provádí pověřená osoba na základě

žádosti vlastníka zdroje. Zdroj reprodukčního materiálu se uznává na dobu určitou, stanovenou v dokladu nebo v rozhodnutí o uznání. Porosty lze uznávat jako zdroje identifikovaného, selektovaného nebo testovaného reprodukčního materiálu pouze na základě údajů platného lesního hospodářského plánu nebo platné lesní hospodářské osnovy (ZÁKON č.149/2003 Sb.).

V České republice nachází nejčastější uplatnění reprodukční materiál lesních dřevin kategorie identifikovaný (listnaté druhy dřevin) a selektovaný (jehličnany). Obdobně tomu tak bývá i ve většině evropských zemí. Oproti lesnický vyspělým zemím Evropské unie nicméně ČR částečně zaostává ve využívání semenných sadů, tedy u reprodukčního materiálu lesních dřevin kategorie kvalifikovaný (NĚMEC, 2015).

Do uznané jednotky se řadí pouze uznané zdroje poskytující reprodukční materiál stejné kategorie (VYHLÁŠKA č.29/2004 Sb.).

## 8.2. Manipulace s reprodukčním materiálem

Reprodukční materiál lesních dřevin projde před svým konečným využitím pro umělou obnovu lesa a zalesňování s ohledem na vlastnickou strukturu lesů v České republice a organizační zajištění jejich obhospodařování několika vývojovými etapami. Na počátku je zdroj reprodukčního materiálu (lesní porost, semenný sad, apod.), ze kterého mohou oprávněné osoby sbírat semenný materiál, odebírat části rostlin nebo pod lesními porosty vyzvedávat sadební materiál z přirozeného zmlazení. Další etapou je pěstování sadebního materiálu v lesních školkách. Poslední etapou je potom výsadba. Mezi každým takovým článkem může existovat řada dalších, zejména obchodních vazeb. Aby bylo v maximální možné míře zajištěno, že původ deklarovaný na průvodní dokumentaci k reprodukčnímu materiálu odpovídá skutečnosti, byl přijat zákon č. 149/2003 Sb. ve znění pozdějších předpisů (dále jen „zákon“) a jeho prováděcí vyhlášky, zejména vyhláška č. 29/2004 Sb., taktéž ve znění pozdějších předpisů. Tato právní úprava má za cíl především zajistit ochranu spotřebitele, tzn. zajistit, aby spotřebitel (vlastník lesa) při nákupu zboží (reprodukčního materiálu) obdržel materiál deklarovaných parametrů, zejména s ohledem na jeho genetickou a morfologickou kvalitu. Z toho důvodu zákon nastavuje pravidla a podmínky, za kterých je možné s reprodukčním materiálem lesních dřevin obchodovat, ve smyslu zákona jej uvádět do oběhu.

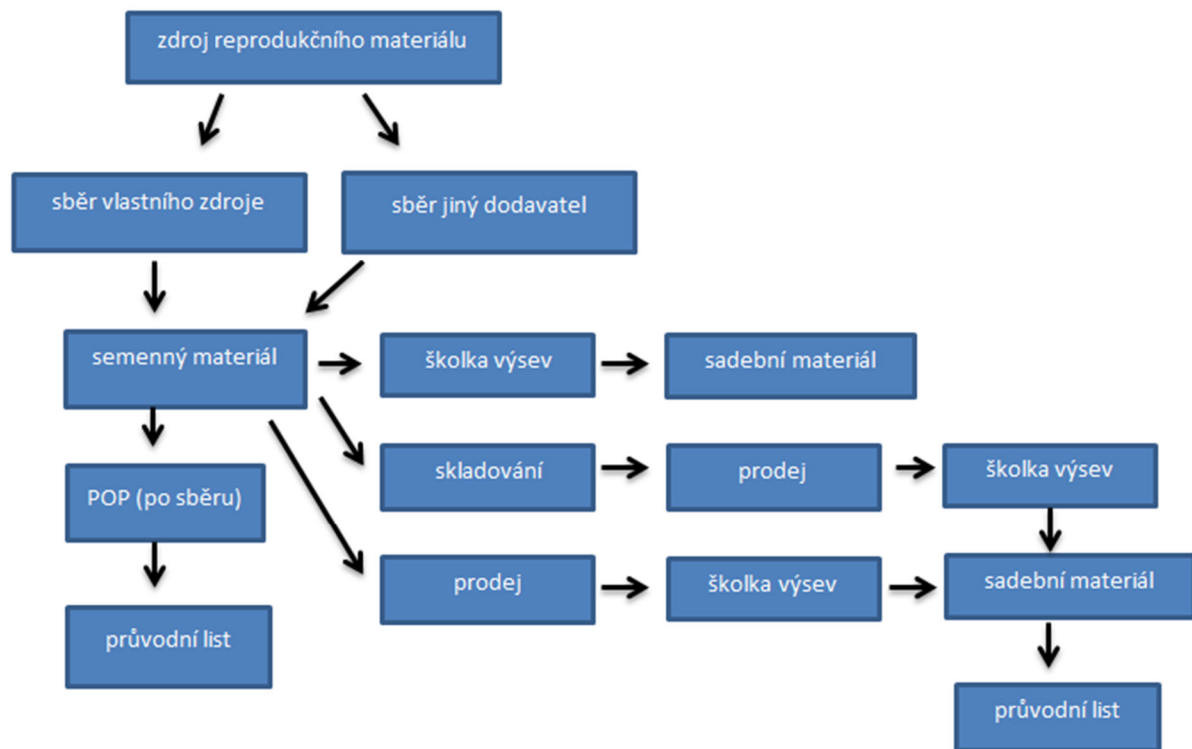
Kontrolou dodržování těchto pravidel je ve smyslu zákona pověřen Ústav pro hospodářskou úpravu lesů Brandýs nad Labem, tak zvaná pověřená osoba (dále jen „ÚHÚL“) (PAŘÍZEK, 2008).

Pro reprodukci lesů je vhodné volit zdroje na základě původu a hospodářské hodnoty - zejména produkce, stability a zdravotního stavu. Tento materiál by se měl dále využívat na vhodných stanovištích, na jeho podmínky je buď dlouhodobým přirozeným výběrem adaptován, nebo kde jsou předpoklady, že s ohledem na svůj adaptační potenciál se bude moci zvoleným lokalitám hodně přizpůsobit.

BERNHARDT (1996), HOSIUS ET EL. (1996) uvádějí příčiny vzniku záměn reprodukčního materiálu. Manipulace s reprodukčním materiálem lesních dřevin od sběru plodů a semen lesních dřevin až po jeho využití pro obnovu lesních porostů nebo zalesňování představuje dlouhý proces s četnými uzly v produkčním řetězci. Při porušení některých předpisů jsou taxativně stanoveny pokuty, a to v případě, kdy dochází k neoprávněnému sběru semen a plodů lesních dřevin, k neoprávněnému vyzvedávání semenáčků a sazenic a k porušení předpisů o evidenci semen a sazenic lesních dřevin. K případům porušování zákona o lesích a příslušné vyhlášky o lesním reprodukčním materiálu může docházet prakticky ve všech fázích procesu. V této souvislosti může docházet k porušování předpisů i ve vedení povinné evidence. Evidence nemusí být vedena vůbec, nebo je neúplná či dokonce nesprávná, a to buď z neznalosti předpisů, z nedbalosti, nebo v extrémním případě může dojít i k úmyslné falzifikaci. K porušování zásad evidence může docházet dále v lesních školkách při výsevu osiva, školkování semenáčků, při sklizni sazenic či při expedici. Tyto nedostatky mohou spočívat v tom, že původ reprodukčního materiálu je na záhonech špatně označen, to se paralelně objevuje i v písemných dokladech. Problém může nastat v souvislosti s vyzvedáváním sazenic, při jejich přípravě k expedici. Nejčastější příčinou může být omyl, úmyslné zkreslení nebo nedostatečná péče při práci (ŠINDELÁŘ, 2000).

Problémy s evidencí vznikaly a nadále vznikají u plodů a semen dřevin, které se vykupují od sběračů. Jde prakticky o sklizeň žaludů a bukvic. Další možný případ je porušování předpisů o evidenci o původu, který navazuje na vhodný či nevhodný způsob organizace sklizně, je smíchání plodů nebo semen při skladování a dopravě. V semenářském závodě je systém kontroly evidence dobře propracován, ovšem dojde – li do semenářského závodu zásilka semenného materiálu se špatně indikovaným původem, pak je tato chyba bez využití nástroje analýzy genetické informace nedetekovatelná.

Kontrolovaná je vazba mezi získaným osivem, sadebním materiálem v držení a sadebním materiálem uvedeným do oběhu. Kritickým bodem je výpěstnost a možnost „legalizace“ semenného materiálu. Dalším kritickým místem je v případě školkařských provozů s více provozovny záměna původu u pěstovaného sadebního materiálu za účelem snížení nákladů na transport sadebního materiálu požadované provenience z místa pěstování do místa výsadby, a toto obdobně platí mezi různými školkařskými subjekty na základě dohody. V případě obchodování se sadebním materiálem mezi dodavateli prací v lese musí množství uvedené do oběhu odpovídat nákupu. Kritickým místem je záměna původu různých oddílů sadebního materiálu z organizačních důvodů (PAŘÍZEK, 2008).



Obrázek 34 Fiktivní schéma spotřebitelského řetězce (modifikováno podle PAŘÍZKA)



### 8.3. Kontrolní systém

Současný systém kontroly je založen na souladu evidence vedené dodavateli reprodukčního materiálu a informacemi, kterými disponuje pověřená osoba. Je efektivním nástrojem schopným systémově zajišťovat správnost původu reprodukčního materiálu deklarovaného na průvodní dokumentaci. Kontrola je založena na rekonstrukci spotřebitelského řetězce, který začíná sběrem reprodukčního materiálu ze zdroje za tímto účelem uznaným, přes obchodování se všemi druhy reprodukčního materiálu až po výsadbu takového materiálu. K tomu, aby mohl být spotřebitelský řetězec rekonstruován, má pověřená osoba (ÚHÚL) k dispozici řadu oprávnění a nástrojů (např. kontrola sběru reprodukčního materiálu, vystavování potvrzení o původu, hlášení o reprodukčním materiálu atd.).

Kontrolována je vazba mezi množstvím před zpracováním semenného materiálu nebo množstvím na nabývacím dokladu k němu a množstvím uvedeným do oběhu. Pokud jsou správné informace o množství osiva na nabývacím dokladu, je prostor pro legalizaci jiného reprodukčního materiálu v tomto článku relativně malý, významněji může hrozit záměna označení různých oddílů bez zásadního vlivu na jeho celkové množství. Doposud nebyl k dispozici nástroj, který by umožňoval fakticky ověřit deklarovaný původ reprodukčního materiálu na základě jeho genetických charakteristik. I když tedy v některých případech měli zástupci pověřené osoby pochybnosti o deklarovaném původu, nemohli v případě formální správnosti průvodních dokumentů toto zpochybnit. Proto je žádoucí kontrolní systém zefektivnit nasazením nástrojů molekulární genetiky.

### 8.4. Sběr reprodukčního materiálu

Celý proces sběrů semen a plodů lesnicky významných druhů dřevin z uznaných zdrojů reprodukčního materiálu lesních dřevin podléhá zákonu o obchodu s reprodukčním materiálem lesních dřevin (VYHLÁŠKA č.149/2003 Sb.). Oprávněné osoby mohou sbírat reprodukční materiál lesních dřevin pro účely umělé obnovy lesa a zalesňování. Sběr mohou provádět pouze osoby s licenci udělenou podle zákona Ministerstvem zemědělství České republiky (KOTRLA, PAŘÍZEK, CAFOUREK, 2003).

Před začátkem sběru reprodukčního materiálu je dodavatel povinen oznámit pověřené osobě nejméně 15 dnů předem:

- a) konání sběru semenného materiálu, odběru částí rostlin nebo vyzvedávání sadebního materiálu z přirozeného zmlazení, jde-li o identifikovaný, selektovaný, kvalifikovaný nebo testovaný reprodukční materiál,
- b) konání odběru částí rostlin, jde-li o následně vegetativně množený selektovaný, kvalifikovaný nebo testovaný reprodukční materiál,
- c) sloučení reprodukčního materiálu (ZÁKON č.149/2003 Sb.,§5A).

Tato kontrola spočívá buď v provedení úkonů předcházející kontrole, nebo provedením fyzické kontroly sběru na místě přítomností po celou dobu sběru. Pokud byly splněny všechny podmínky stanovené tímto zákonem a jeho prováděcími právními předpisy, vystaví orgán veřejné správy po sběru semenného materiálu dodavateli na jeho žádost pro získaný oddíl potvrzení o původu do 10 dnů ode dne doručení žádosti.

Sběr může být uskutečnitelný za následujících podmínek:

- a) Identifikovaný reprodukční materiál (DB, DBZ, BK) – sběr z min. 10 stromů z uznané jednotky
- b) Selektovaný reprodukční materiál (SM, BO, MD, DB, DBZ, BK) – sběr z min. 20 stromů z uznané jednotky
- c) Semenné sady – min 50% klonů plodí (BO, MD, SM)
- d) Semenné sady – min 30% klonů plodí – ostatní dřeviny (ÚHÚL 2016).

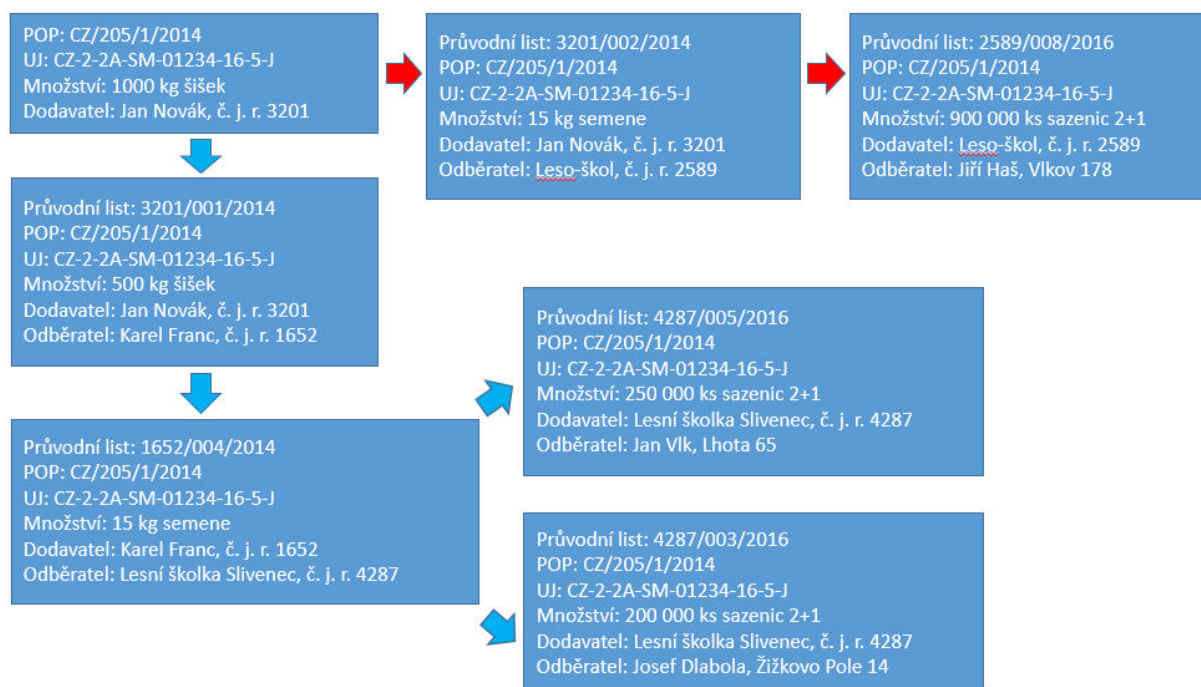
Způsob sběru semen se volí tak, aby sběrem podstatně neutrpěl mateřský porost, aby nedošlo k poškození sbíraného osiva a neutrpěla jakost. V současné semenářské praxi se užívá několik způsobů sběru:

- 1) Ze stojících stromů - provádí trhači vybaveni lezeckými pomůckami. K tomuto postupu byly často používány stupačkové soupravy, s jejichž pomocí trhač vystoupal nahoru, ovšem při častém používání stupaček na tomtéž stromě docházelo k jeho poškozování. Stupačkové soupravy byly nahrazovány různými druhy žebříkových a lanových systémů. V poslední době se setkáváme se sběrem osiva ze stojících stromů pomocí horolezecké techniky. Tento způsob je velmi šetrný ke stávajícím porostům (BURDA, 2009).

- 2) Sklepávání na plachty - v příhodných podmínkách a nebo sběrem semen ze země  
(u některých listnáčů)
- 3) Z pokácených stromů.

## 8.5. Uvádění osiva do oběhu

Kontrolována je vazba mezi množstvím před zpracováním semenného materiálu nebo množstvím na nabývacím dokladu k němu a množstvím uvedeným do oběhu. Pokud jsou správné informace o množství osiva na nabývacím dokladu, je prostor pro legalizaci jiného reprodukčního materiálu v tomto článku relativně malý, významněji může hrozit záměna označení různých oddílů bez zásadního vlivu na jeho celkové množství.



Obrázek 35 Fiktivní rekonstrukce spotřebitelského řetězce

## 8.6. Uvádění sadebního materiálu do oběhu

Podle Zákona č. 149/2003 Sb., uváděním do oběhu reprodukčního materiálu lesních dřevin se rozumí: „nabízení reprodukčního materiálu k prodeji, prodej nebo dodávka třetí osobě včetně dodávky na základě smlouvy o poskytnutí služeb, anebo jakýkoliv jiný způsob převodu práva nakládat s reprodukčním materiálem na jinou osobu při podnikání, a dovoz za účelem prodeje anebo poskytování vzorků genetických zdrojů; za uvádění do oběhu se nepovažuje převod práva nakládat s reprodukčním materiálem, pokud jde o první převod tohoto práva z vlastního zdroje reprodukčního materiálu na jinou osobu a vlastník zdroje

reprodukčního materiálu ani jeho zaměstnanci se v souvislosti s tímto převodem nepodílí na produkci reprodukčního materiálu“. Reprodukční materiál lesních dřevin mohou uvádět do oběhu pouze dodavatelé - držitelé licencí.

Reprodukční materiál zůstává ve všech fázích produkce a uvádění do oběhu rozdělen do oddílů, přesně známé velikosti, sklizených ve stejném čase z téhož zdroje reprodukčního materiálu. Oddíl semen je zpracován, skladován, ošetřen společně stejným způsobem.

U sazenic má oddíl stejný způsob a stejnou dobu pěstování. Každý oddíl musí být počínaje sběrem v celém průběhu produkce opatřen průvodní dokumentací a označen tak, aby nemohlo dojít k záměně s jiným oddílem. Do oběhu lze reprodukční materiál uvádět pouze s připojeným průvodním listem, vystavený dodavatelem, obsahující údaje (LONGAUER, 2014):

- a) označení dodavatele,
- b) identifikační číslo a číslo licence dodavatele,
- c) označení odběratele,
- d) množství reprodukčního materiálu a počet balení,
- e) údaj o tom, zda byl reprodukční materiál množen vegetativně.

Každý průvodní list se skládá ze dvou částí - vlastního dokumentu a průvodního štítku.

Průvodní štítek se k jednotlivým typům reprodukčního materiálu připojuje následovně:

- e) U semenného materiálu se ke každému balení jednou vkládá průvodní štítek dovnitř, a jednou se připojuje vně formou štítku.
- f) U částí rostlin se průvodní štítek připojuje vně ke každému balení.
- g) U sadebního materiálu se průvodní štítek připojuje k celé zásilce (ÚHUL, 2016).

Průvodní list semen a plodů uváděných do oběhu jako identifikovaný, selektovaný, kvalifikovaný nebo testovaný reprodukční materiál, musí mít průvodní list, který obsahuje dále dle ZÁKONA č.149/2003 Sb. následující údaje:

- a) o čistotě, tedy hmotnostním podílu čistých semen nebo plodů, semen nebo plodů jiných druhů a neškodných nečistot připadajících na produkt uváděný do oběhu jako oddíl osiva,
- b) o klíčivosti čistých semen nebo plodů; v případě, že klíčivost není možné zjistit, o životaschopnosti zjištěné za pomoci specifických metod,
- c) o hmotnosti 1 000 čistých semen plodů,
- d) o počtu klíčivých semen nebo plodů na kilogram produktu uváděného do oběhu jako semenný materiál.

Každý oddíl reprodukčního materiálu lesních dřevin v celé EU – od sklizně semene resp. odběru částí rostlin vegetativním množením až po jeho použití provází potvrzení o původu s evidenčním číslem zdroje a údaji o původu oddílu. Potvrzení o původu je základním dokladem (“rodným listem“) každého oddílu reprodukčního materiálu. V návaznosti na potvrzení o původu je každý oddíl reprodukčního materiálu identifikován:

- h) českým a vědeckým názvem dřeviny, popřípadě označení klonu nebo směsi klonů
- i) oblastí provenience,
- j) původem,
- k) výškovým pásmem,
- l) typem zdroje reprodukčního materiálu,
- m) účelem použití reprodukčního materiálu,
- n) rokem zrání, u směsi roky zrání, jde-li o semenný materiál,
- o) stářím a druhem semenáčků nebo řízků použitých jako sadební materiál a to, zda byly podřezány, školkovány nebo obaleny,
- p) kategorií reprodukčního materiálu.

Mimo výše uvedené údaje, musí být každý oddíl identifikovaného, selektovaného, kvalifikovaného nebo testovaného reprodukčního materiálu opatřen:

- a) číslem potvrzení o původu
- b) evidenčním číslem uznané jednotky
- c) údajem o tom, zda se jedná o geneticky modifikovaný reprodukční materiál

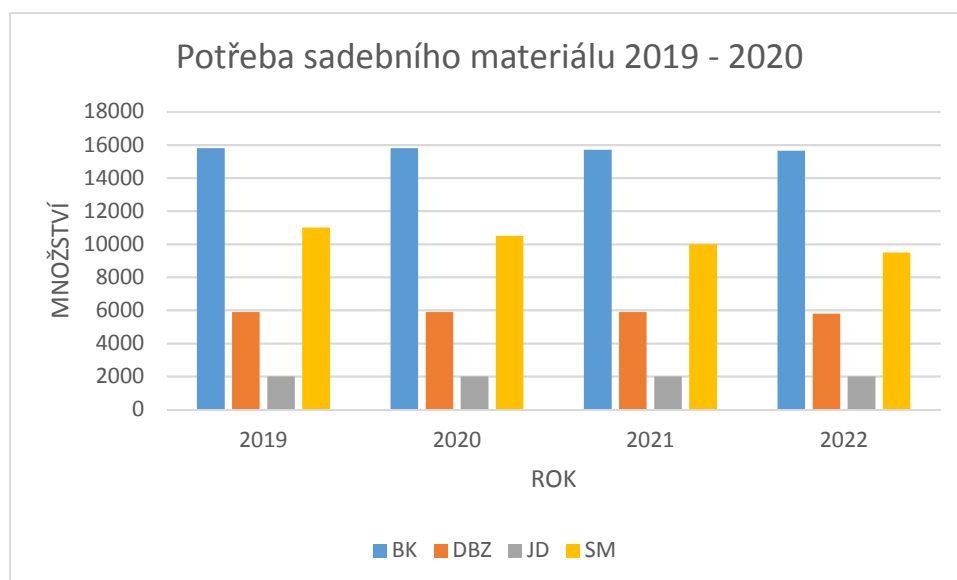
Evidenční číslo zdroje je klíčovou součástí potvrzení o původu a slouží k identifikaci oddílů reprodukčního materiálu v rámci EU. Pověřená osoba po ukončení sběru semenného materiálu, odběru částí rostlin nebo vyzvednutí sadebního materiálu z přirozeného zmlazení dodavateli na jeho žádost pro získané oddíly vystaví potvrzení o původu do 10dnů ode dne jeho žádosti, pokud byly splněny podmínky stanovené zákonem a předpisy vydanými jeho provedením (ZÁKON č.149/2003 Sb.).

## 9. Výhled potřeb sadebního materiálu

Výhled potřeb sadebního materiálu zájmových dřevin vychází z předpokládaného rozsahu obnovy lesa u Lesů České republiky, s.p., zajišťovaného sadebním materiálem z externích zdrojů, aktuálního podílu přirozené obnovy (cca 30 %) a odhadovaného vývoje klimatické situace v České republice. Vzhledem k současné kalamitní situaci vyvolané rozvojem škůdců a škodlivých činitelů bude tento výhled do budoucna pravděpodobně upraven tak, aby zohledňoval tyto faktory.

Předkládaný výhled je rozčleněn podle jednotlivých přírodních lesních oblastí (PLO) a je každoročně aktualizován. Seznam neobsahuje přírodní lesní oblast 22 na jejímž území Lesy České republiky, s. p. neobhospodařují žádný majetek (zdroj: webové stránky LČR, 2018).

Lesy České republiky vychází z předpokládaného rozsahu obnovy lesa, zajišťovaného sadebním materiálem z externích zdrojů, aktuálního podílu přirozené obnovy a odhadovaného vývoje klimatické situace v ČR.



Graf 1: Výhled potřeb sadebního materiálu pro roky 2019–2022 u nejrizikovějších dřevin (tis. ks)

Graf 1 byl vytvořen pomocí dat, které jsou k dispozici na portálu <http://lesy-cr.cz>. Byla použita data ze všech PLO, mimo PLO 22, na jejímž území Lesy České republiky neobhospodařují majetek. V tomto grafu je zobrazen výhled předpokládaných potřeb

sadebního materiálu (dřeviny SM, JD, BK, DBZ) pro rok 2019 – 2022. Vzhledem k aktuální kalamitní situaci se smrkem ztepilým je množství jeho předpokládané budoucí potřeby diskutabilní. Analogicky k tomu lze předpokládat změnu v potřebách reprodukčního materiálu ostatních druhů lesních dřevin pro umělou obnovu.

Vzhledem k neoddiskutovatelně probíhající klimatické změně je třeba zvažovat modifikaci druhové skladby. Dřevina, která by mohla nahradit smrk, je douglaska tisolistá (*Pseudotsuga menziesii*), ale jedná se o nepůvodní dřevinu, tudíž při její výsadbě vše závisí na dohodě s orgány ochrany přírody. Další náhradou za smrk by mohla být jedle nebo modřín. Smrk je nahraditelný i listnatými dřevinami, které by mohly lesy stabilizovat. Dub je na tom velmi dobře z hlediska odolnosti a stability lesa, mohl by brát v úvahu jako náhrada za borovici. Podobně je tomu tak i u buku, který dokáže odolávat dlouhým obdobím sucha. Obecně by měly být v nižších polohách vysazovány zejména listnáče – javory, duby, topoly, na suchých a chudých stanovištích více uplatňována borovice.



## 9.1. Rizika porušování právních předpisů a pravděpodobné nelegální toky reprodukčního materiálu lesních dřevin

V obecné rovině se porušením pravidel při přenosu reprodukčního materiálu rozumí jakákoliv činnost probíhající v rozporu s příslušnými legislativními předpisy. Je pravděpodobné, že případné nelegální aktivity v oblasti přenosu reprodukčního materiálu reagují na aktuální situaci na trhu ve vztahu k dostupnosti reprodukčního materiálu a jeho aktuální potřebě. Tato potřeba je v různých časových periodách různá. Velmi pravděpodobně se významně dotýká reprodukčního materiálu důležitých hospodářských dřevin (BO, BK, DB, SM, JD a další). Vzhledem k současné kalamitní situaci v lesním hospodářství lze předpokládat, že ohroženy nekalými praktikami jsou všechny druhy dřevin, které jsou či budou použity k obnovování lesních porostů.

Podle různých indicií může mimo nekalých machinací s průvodní dokumentací reprodukčního materiálu na území naší republiky (např. cílená záměna průvodní dokumentace, aniž by docházelo k fyzickému transportu reprodukčního materiálu) docházet pravděpodobně také k nelegálním tokům cenově dostupnějšího osiva některých dřevin ze zahraničí (např. bukvic ze Slovenska, borovice z Polska atd.). Další aspekty záměn reprodukčního materiálu jsou zmíněny v kapitole 8.2. Manipulace s reprodukčním materiálem.

Současný systém kontroly je založen na souladu evidence vedené dodavateli reprodukčního materiálu a informacemi, kterými disponuje pověřená osoba. Je efektivním nástrojem schopným systémově zajišťovat správnost původu reprodukčního materiálu deklarovaného na průvodní dokumentaci. Kontrola je založena na rekonstrukci spotřebitelského řetězce, který začíná sběrem reprodukčního materiálu ze zdroje za tímto účelem uznaným, přes obchodování se všemi druhy reprodukčního materiálu až po výsadbu takového materiálu. K tomu, aby mohl být spotřebitelský řetězec rekonstruován, má pověřená osoba (ÚHÚL) k dispozici řadu oprávnění a nástrojů (např. kontrola sběru reprodukčního materiálu, vystavování potvrzení o původu, hlášení o reprodukčním materiálu atd.).

Kontrolována je vazba mezi množstvím před zpracováním semenného materiálu nebo množstvím na nabývacím dokladu k němu a množstvím uvedeným do oběhu. Pokud jsou správné informace o množství osiva na nabývacím dokladu, je prostor pro legalizaci jiného reprodukčního materiálu v tomto článku relativně malý, významněji může hrozit záměna

označení různých oddílů bez zásadního vlivu na jeho celkové množství. Doposud nebyl k dispozici nástroj, který by umožňoval fakticky ověřit deklarovaný původ reprodukčního materiálu na základě jeho genetických charakteristik. I když tedy v některých případech měli zástupci pověřené osoby pochybnosti o deklarovaném původu, nemohli v případě formální správnosti průvodních dokumentů toto zpochybnit. Proto je žádoucí kontrolní systém zefektivnit nasazením nástrojů molekulární genetiky. Těmito metodami lze často závěry evidenční kontroly původu reprodukčního materiálu lesních dřevin rigorózně ověřit.

Pověřená osoba (ÚHÚL) vykonala v roce 2017 celkem 40 kontrol dodavatelů ve smyslu dodržování ustanovení zákona a vyhlášky při uvádění reprodukčního materiálu lesních dřevin do oběhu. Nejčastěji zjištěnými porušeními bylo nesprávné množství reprodukčního materiálu v držení a reprodukčního materiálu uvedeného do oběhu, nepředložení údajů o reprodukčním materiálu, nesprávné uvedení původu reprodukčního materiálu a zjištění reprodukčního materiálu bez prokázaného uvedení jeho původu. Případné pochybnosti o faktickém původu reprodukčního materiálu nemohly být doposud objektivně posuzovány.

Z pohledu uplatnění navržené metodiky (podchycení genetického profilu všech jedinců potenciální rodičovské generace) je nejvhodnějším druhem jedle bělokorá, jelikož šišky jsou sbírány trhači z každého jednotlivého stromu, ze kterého lze při sběru šišek odebrat současně také genetický vzorek mateřského stromu. V případě záchyty plodů do plachet (buk, dub) je identifikace mateřských jedinců rodičovské populace taktéž poměrně snadná. V případě smrku bude žádoucí zaměřit se především na cenné lokální populace, kdy je požadavek na návrat jedinců původního genofondu enormní.

## 10. Dynamický nákupní systém

### 10.1. Obecné zásady

Dynamický nákupní systém je zakotven v zákoně o zadávání veřejných zakázek č.134/2016 Sb. a obsahuje paragrafy: obecné ustanovení, zavedení dynamického systému, zařazení do zavedeného dynamického systému, zadávání veřejné zakázky v dynamickém nákupním systému a oznámení o uzavření smlouvy.

Obecné ustanovení říká, že zadavatel může zavést dynamický nákupní systém, kterým se pro účely tohoto zákona rozumí plně elektronický, otevřený systém pro zadávání veřejných zakázek, jejichž předmětem je pořízení běžného, obecně dostupného zboží, služeb nebo stavebních prací.

Zadavatel zavede dynamický nákupní systém v zadávacím řízení, ve kterém postupuje přiměřeně podle pravidel pro užití řízení. Zadavatel může rozdělit dynamický nákupní systém do kategorií, které jsou objektivně vymezeny na základě předmětu veřejných zakázek nebo jejich územního rozsahu. Při zavedení dynamického nákupního systému platí, že v oznámení o zahájení zadávacího řízení zadavatel uvede také dobu trvání dynamického nákupního systému a označí, že se jedná o zavedení dynamického nákupního systému. Lhůta pro doručení žádosti o účast nesmí být kratší než 30 dnů od zahájení zadávacího řízení, kterým se zavádí dynamický nákupní systém. Zadavatel poskytne dodavatelům neomezený dálkový přístup k zadávací dokumentaci, a to od uveřejnění oznámení o zahájení zadávacího řízení na zavedení dynamického nákupního systému až do ukončení trvání dynamického nákupního systému. V dokumentaci musí být uvedeno:

- a) druh, předmět a předpokládanou hodnotu veřejných zakázek, které mají být zadávány v dynamickém nákupním systému,
- b) informaci o rozdělení do kategorií pro zařazení do dynamického nákupního systému podle těchto kategorií, pokud je dynamický nákupní systém rozdělen na kategorie, a
- c) informace týkající se použitého elektronického nástroje a další technické informace nezbytné pro elektronickou komunikaci.

## 10.2. Dynamický nákupní systém u státního podniku LČR

Dynamický nákupní systém byl zaveden u Lesů České republiky v červnu 2015. Tento systém se využívá především pro zakázky týkající se dodávek služeb pěstování reprodukčního materiálu, provádění pěstebních činností, provádění těžebních činností či asanací lesních pozemků.

Účelem veřejné zakázky v oblasti pěstování reprodukčního materiálu je vypěstování reprodukčního materiálu z osiva garantovaného zdroje, tedy dodaného přímo zadavatelem. Využití tohoto systému, který umožňuje zvýšený dohled nad tokem v produkčním řetězci, má zásadní význam především u superiorního materiálu. Tím je například osivo z genových základů, semenných sadů či ohrožených lokálních populací, testované potomstvo semenných sadů, vegetativně množený reprodukční materiál či sadební materiál pro specifické účely (např. za účelem založení semenné sady, klonového archivu atd.). V rámci dynamického nákupního systému mohou být vždy specifikovány všechny důležité parametry poptávaného plnění. Především se jedná o informace o původu reprodukčního materiálu a jeho charakteru, požadavky na zajištění osiva a způsob pěstování a to včetně geografického upřesnění místa produkce, ošetření a parametry sazenic apod.

V případě produkce sadebního materiálu přes dynamický nákupní systém půjde o jednoduchý typ produkčního řetězce s jednoznačně nadefinovanými články řetězce, použití metodiky ověřování deklarovaného původu je zde proto provozně snadno aplikovatelné. Původ osiva bude deklarován zadavatelem (nicméně i v tomto článku dojde k ověření původu porovnáním genetických profilů smíšeného testovacího vzorku a deklarované rodičovské populace). Možnost subdodávek při produkci sadebního materiálu může být smluvně zakázána. Zpracovatel zakázky (pěstitel) tak bude jediným subjektem v produkčním procesu.

Použití metodiky u složitých pěstitelsko-distribučních řetězců neošetřených pravidly dynamického nákupního systému je z praktického pohledu problematické. Může dojít, a často dochází, k několikanásobnému přeprodeji osiva či sadebního materiálu mezi několika subjekty. V případě odhalení jiného než deklarovaného původu by bylo z právního hlediska dohledání konkrétního viníka velmi obtížné až nemožné.

## 11. Lokalizace zájmových stromů v porostu

Pro potřeby efektivní aplikace metodiky byl posouzen požadavek přesné geografické lokalizace jedinců v porostu (pomocí GPS lokátorů) či jejich přímé fyzické označení (štítky, visačky apod).

Lokalizace stromů, které lze vzhledem k charakteru sběru osiva považovat za potenciální mateřské stromy, je pokládána za žádoucí z následujících důvodů:

- Jednoznačné vymezení lokality sběračům či trhačům
- Možnost kontroly lokality sběru
- Eliminace potřeby opětovné analýzy genetické informace potenciální rodičovské populace při opakovaných sběrech (a zajištění kompatibility dat)

V úvahu připadají dva odlišné způsoby lokalizace zájmových stromů, případně jejich kombinace. Jednou z možností je přesná lokalizace pomocí GPS souřadnic. Tato v teoretické rovině optimální metoda má však z praktického pohledu mnohá úskalí a až kritická omezení. Naopak fyzické značení stromů v porostu je technicky snadno proveditelné (např. natloukací plíšky), strom je nezaměnitelně označen, identifikace stromu slouží ke snadnému spárování s databází genetické informace (lze automatizovat s využitím čárového kódu a čtečky kódů) a fyzické označení taktéž slouží pro dobrou orientaci v porostu.

### 11.1. Značení pomocí geografických souřadnic

I u velmi přesných GPS přístrojů (uváděná odchylka určení polohy v řádu jednotek centimetrů až milimetrů) dochází pod podrostem či v zápoji korun stromů k rapidnímu poklesu přesnosti určení souřadnic. Přesnost určení pozice a její závislost na zastínění čidla byla experimentálně ověřena zpracovateli projektu (geografická totální stanice GX1230 + GNSS). Výsledky našeho měření podporují obecně známé závěry, a to, že nepřesnost měření při absenci přímé viditelnosti čidla, je natolik vysoká, že neumožňuje jednoznačné určení konkrétního stromu pomocí geografických souřadnic ani s využitím velmi přesných GPS přístrojů.

Další nevýhodou při zaměřování pozice stromu pomocí GPS je absence fyzického označení stromu – v porostu není možno bez příslušného přístroje a přístupu k GPS databázi ověřit statut stromu. Jednoduché a přímé zaznamenání identifikačního označení stromu při sběru osiva či orientace podle značení stromů v porostu je v tomto případě nemožná.

## 11.2. Fyzické označení stromů v porostu

Označení stromu je vhodné provést pomocí maximálně trvanlivého značení. Z toho důvodu jsou kromě obligátního značení a popisu sprejem považovány za vhodné kovové plíšky, na které budou údaje zaznamenány gravírováním. Údaje, které by byly zaznamenány na štítku, jsou číselný kód (možnost okamžitého přečtení v terénu) a čárový kód sloužící pro automatizované načtení pomocí čtečky čárového kódu a spojení s elektronickou databází, která může být průběžně upravována.

Při realizaci sběru v porostech, kde již dříve proběhla analýza genetické informace, lze pomocí fyzického označení lépe nadefinovat oblast sběru - evidovat označení mateřských stromů, v jejichž blízkosti sběr probíhá. Případně doporučit sběr přímo pod označenými stromy. Tímto dojde k aktivnímu nasměrování sběrače k požadovanému zdroji osiva. Uvedený postup nicméně předpokládá vytvoření závazné metodiky sběru.

Pro rámcovou představu finanční nákladnosti výroby štítků byla poptána u firmy Lintech s.r.o ([www.lintech.cz](http://www.lintech.cz)) výroba štítků této specifikace:

*Materiál dural eloxovaný tl. 1mm, značení provedeno gravírováním, otvor pro uchycení 2x prům. 3mm.*

*Cena technické přípravy výroby je 250 Kč bez DPH, jednotková cena štítku v rozměru 60 x 25 mm je 28, 90 Kč bez DPH pro celkový počet 1000 ks štítků, při objednávce 10 000 ks štítků je jednotková cena 17, 60 Kč bez DPH.*

Závěrem lze konstatovat, že způsob značení formou viditelné identifikace je pro účely vedení evidence zájmových stromů dostačující a není nutno zvažovat ani kombinaci uvedených metod.

## D. Legislativa

### 12. Přenos reprodukčního materiálu

Původ reprodukčního materiálu má mimořádně velký význam pro stabilitu a produkční kvalitu lesních porostů. Demonstruje to mimo jiné řada provenienčních pokusů, ve kterých například odlišné provenience smrku vykazují již ve věku 45 let odlišnost v objemu středního kmene o čtvrtinu až polovinu a v zásobě na jednotku plochy jsou mezi nimi zjištěny až dvojnásobné rozdíly (LONGAUER 2014). Proto by mělo být cílem vlastníků lesa používat pro umělou obnovu lesa geneticky vhodný reprodukční materiál co nejbližší místu, kde se nachází zdroj tohoto materiálu. Rámcem pro přenos reprodukčního materiálu jsou tzv. oblasti provenience. Pro podmínky ČR a účely zákona č. 149/2003 Sb. a vyhlášky č. 29/2004 Sb. jsou oblasti provenience ztotožněny s přírodními lesními oblastmi. Jsou to oblasti s obdobnými růstovými podmínkami, v nichž jednotlivé druhy lesních dřevin, při zohlednění nadmořské výšky vykazují obdobné fenotypové znaky. Území České republiky je v horizontálním směru rozčleněno na 41 PLO.

Ve vertikálním směru se člení území České republiky na 9 lesních vegetačních stupňů, které vyjadřují vertikální členitost vegetace v závislosti na dlouhodobých charakteristikách prostředí. Jednotlivým lesním vegetačním stupňům odpovídá určitá klimaxová vegetace, kterou charakterizuje dřevinná složka (PALÁTOVÁ 2007). Nelze –li pokrýt potřebu reprodukčního materiálu v rámci dané PLO, lze provádět jeho přenos mezi jednotlivými oblastmi způsobem stanoveným ve Vyhlášce č. 139/2004 Sb., která určuje přenos reprodukčního materiálu mezi 1. – 4. lesním vegetačním stupněm bez omezení s výjimkou přírodních lesních oblastí 17 (Polabí), 34 (Hornomoravský úval) a 35 (Jihomoravské úvaly), ve kterých nelze do prvního lesního vegetačního stupně přenášet reprodukční materiál ze třetího a čtvrtého stupně.

Od pátého lesního vegetačního stupně lze přenášet reprodukční materiál s vertikálním posunem o plus nebo minus jeden lesní vegetační stupeň s tím, že lze přenášet reprodukční materiál ze čtvrtého do pátého stupně a naopak. Smrk a kleč nelze přenášet z nižších stupňů do osmého a devátého lesního vegetačního stupně, lze provést jejich vzájemný přenos mezi osmým a devátým lesním vegetačním stupněm.

Pokud je nezbytný přenos mezi PLO, řídí se pravidly stanovenými pro jednotlivé dřeviny vyhláškou 139/2004 Sb. Ve vyhlášce jsou uvedeny pro jednotlivé dřeviny přehledy s taxativním

vymezením, ze kterých PLO je možné reprodukční materiál do dané PLO vnášet. Při přenosu je třeba respektovat povolený vertikální posun, jehož zásady jsou stejné jako při přenosu v rámci PLO (PALÁTOVÁ 2007).

Ústřední evidence oddílu reprodukčního materiálu, které jsou u dodavatelů v držení a jdou uváděny do oběhu, je vedena v databázi ERMA2. Dodavatelé jsou povinni pověřené osobě předat údaje do 15. ledna každého kalendářního roku se stavem k 31.12. kalendářního roku předcházejícího. Tyto údaje jsou zaneseny do databáze ERMA2 buď dodavateli přes webové rozhraní na portálu Ministerstva zemědělství „eAGRI“ nebo pracovníky pověřené osoby na základě analogových podkladů dodavatelů.

Požadavek na původnost sadebního materiálu je dán mimo jiné se špatnými historickými zkušenostmi s lesními dřevinami neznámého původu. Problémy s nevhodnými proveniencemi byly a jsou známy například u modřínu („alpský“ modřín se šavlovitým kmenem je náchylný na rakovinu kmene), borovice lesní (problémy s poškozováním těžkým sněhem), dubu (problém s křivostí a sukovitostí kmene). V souvislosti s bukem lesním se uvádí jako odstrašující příklad obchod s bukvicemi sbíranými v nekvalitních, ale pravidelně plodících bukových porostech v Nizozemsku, která se distribuovala do celé západní Evropy (LONGAUER 2014)

Rizikových míst záměny reprodukčního materiálu je několik, počínaje zdrojem osiva a konče předávkou sazenic. Problematická je často už i evidence, kdy je osivo sebráno z jiného stromu nebo například z neuznané jednotky, což by mělo být eliminováno v případě kontroly sběru. Dále může dojít ke smísení osiva při skladování a dopravě. Tyto nedostatky mohou vznikat zejména v souvislosti se získáváním materiálu výkupem. K porušování pravidel může dojít i v lesních školkách, kde je původ reprodukčního materiálu na místech použití nesprávně indikován. Také při vyzvedávání sazenic a při expedici může dojít k neúmyslné či úmyslné záměně.

Úmyslné záměny reprodukčního materiálu bezpochyby nejvíce ovlivňuje ekonomická stránka a aktuální nabídka a poptávka. Rizikem jsou také nelegální příhraniční přenosy sadebního materiálu iniciované odlišnou cenou (např. v Polsku je často k dispozici levnější sadební materiál než v České republice). Je prokázáno, že i z České republiky byl nelegálně vyvezen sadební materiál s doklady, které neodpovídaly skutečnosti. Tento problém bude



pravděpodobně eliminován právě možností kontroly původu sadebního materiálu pomocí vytvořené metodiky, a to ideálně ve všech uzlech produkčního řetězce.

### 12.1. Možnosti přenosu osiva a sadebního materiálu do ČR ze zahraničí

Systém pro reprodukční materiál lesních dřevin ošetřuje Směrnice Rady Evropských společenství 1999/105/ES o obchodu s reprodukčním materiálem lesních dřevin. Obsahuje společné definice souvisejících pojmů pro celou Evropskou unii, vymezuje působnost i dřeviny, na které se vztahuje, povinnosti členských států a Evropské komise. Reprodukční materiál, který vyhoví požadavkům směrnice, nesmí na společném trhu EU podléhat žádným dodatečným omezením. Směrnice dovoluje, aby členské státy na jejich vlastním území stanovily dodatečné nebo přísnější požadavky na uznání zdrojů pro specifické klimatické nebo stanovištní podmínky. Připouští se také dodatečné požadavky na vnější kvalitu reprodukčního materiálu. Geneticky modifikovaný reprodukční materiál lesních dřevin se smí uvést do oběhu pouze po vyhodnocení rizika pro životní prostředí a dalších požadavků zvláštních předpisů EU.

Dovoz reprodukčního materiálu za účelem jeho propouštění do celního režimu volného oběhu lze uskutečnit pouze:

- a) Na základě povolení ministerstva,
- b) Na základě rozhodnutí Rady EU o rovnocennosti reprodukčního materiálu lesních dřevin vyprodukovaného ve třetích zemích.

Ministerstvo povolí dovoz reprodukčního materiálu na základě rozhodnutí Komise EU. Při podání celního prohlášení je dovozce povinen tuto skutečnost oznámit celnímu úřadu a současně mu předložit povolení k dovozu reprodukčního materiálu vydané ministerstvem. Nepředloží-li dovozce celnímu úřadu povolení k dovozu reprodukčního materiálu, celní úřad zboží nepropustí do celního režimu volného oběhu. Dodavatel musí mít při dovozu zaevidovaný každý oddíl reprodukčního materiálu, který uvedl do oběhu, a tuto evidenci musí uchovávat po dobu 10 let od uvedení do oběhu (ZÁKON č. 149/2003 Sb.). Pohyb reprodukčního materiálu lesních dřevin mezi ČR a členskými státy ES, začal být centrálně evidován v souladu s platnými legislativními předpisy od roku 2004 (ÚHÚL 2016).

Reprodukční materiál může být uváděn na trh pouze v oddílech s následujícími údaji:

- a) kódem a číslem o původu;
- b) botanickým názvem;
- c) kategorií;
- d) účelem;
- e) typem zdroje;
- f) registračním označením nebo kódem oblasti provenience;
- g) oblastí provenience - pro reprodukční materiál kategorií „identifikovaný zdroj“ a „selektovaný“ nebo případně jiný reprodukční materiál;
- h) popřípadě určením původu materiálu (je či není autochtonní nebo indigenní anebo je neznámého původu);
- i) u semenného materiálu rokem zrání;
- j) stářím a druhem semenáčků nebo řízků použitých jako sadební materiál a údajem o tom, zda byly podřezány, školkovány nebo obaleny;
- k) zda jde o geneticky modifikovaný materiál.

Dále musí být reprodukční materiál opatřen etiketou nebo jiným dokumentem dodavatele, v němž musí být uvedeny následující údaje:

- a) číslo listu o původu;
- b) jméno dodavatele;
- c) dodané množství;
- d) v případě reprodukčního materiálu kategorie „testovaný“ jehož zdroj byl uznán, slova „předběžně uznáno“;
- e) zda byl materiál množen vegetativně (SMĚRNICE RADY 1999/105/ES).

Podle obecného prohlášení by měly být při zalesňování a obnově lesa používány přednostně původní domácí druhy a druhy místní provenience, které jsou plně přizpůsobeny místním stanovištním podmínkám. Je třeba zajistit, aby vedle požadovaných fenotypových a genetických znaků mohl být reprodukční materiál, který je nebo má být uveden na trh, správně určen od okamžiku sběru až do dodání konečnému spotřebiteli. Uvažovat o dovozu reprodukčního materiálu ze zahraničí a jeho realizaci by se mělo jen v případě nedostatku, které se mohou zejména u některých druhů dřevin vyskytnout, podle možnosti obnovy a

zalesňování odložit na blízké období, kdy by již mělo být domácí osivo k dispozici (ŠINDELÁŘ J., FRÝDL J. 2008). Semenný materiál by měl být uváděn na trh pouze v uzavřeném obalu. Uzávěr musí být zhotoven tak, aby jej po otevření nebylo možné znovu použít.

V roce 2016 podle informací o nakládání s reprodukčním materiálem lesních dřevin České republiky, který je vydán každý rok Ústavem pro hospodářskou úpravu lesů Brandýs nad Labem bylo vyvezeno z České Republiky 5 112,25 kg osiva listnatých a 190,05 kg jehličnatých dřevin. Z listnatých dřevin převažoval buk lesní (*Fagus sylvatica*), u jehličnatých dřevin převažovala jedle bělokorá (*Abies alba*). Dále bylo vyvezeno 2 821 934 ks sazenic jehličnatých dřevin, nejvíce smrku ztepilého (*Picea abies*). A dovoz představoval 56,25 kg semenného materiálu jehličnatých dřevin a 5 925 kg semenného materiálu listnatých dřevin. V největším množství byl dovezen dub zimní (*Quercus petraea*) a to 5 000 kg semenného materiálu. Dále byl pověřené osobě nahlášen dovoz celkem 1 380 ks sadebního materiálu, s největším množstvím modřínu opadavého (*Larix decidua*).

## 13. Stávající kontrolní mechanismy pro přenos sadebního materiálu v ČR

Na základě ustanovení §26 Zákona č. 149/2003 Sb. veřejnou správu v oblasti ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin a uvádění reprodukčního materiálu do oběhu vykonávají:

- a) obecní úřady s rozšířenou působností,
- b) krajské úřady,
- c) ministerstvo
- d) Česká inspekce životního prostředí,
- e) celní úřad,
- f) vojenský lesní úřad- ve vojenských lesích.

Mimo výše zmíněné orgány veřejné správy je ministerstvem pověřena k provádění odborných úkonů a kontrolou v oblasti nakládání s reprodukčním materiálem tzv. pověřená osoba. Orgány veřejné správy a pověřená osoba na základě pověření jsou povinny kontrolovat dodržování povinností stanovených tímto zákonem.

Pověřenou osobou je na základě pověření Ministerstva zemědělství České republiky Ústav pro hospodářskou úpravu lesů, v minulosti byl pověřenou osobou Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti Jíloviště- Strnady. Od roku 2014 na portálu Ministerstva zemědělství je webová aplikace o evidenci reprodukčního materiálu ERMA2.

Tuto evidenci vede pověřená osoba v Rejstříku uznaných zdrojů reprodukčního materiálu, přičemž u každé uznané jednotky eviduje druh dřeviny, kategorii reprodukčního materiálu, typ zdroje reprodukčního materiálu, evidenční číslo, polohu, nadmořskou výšku nebo výškové pásmo, plochu, původ a v případě testovaného reprodukčního materiálu údaj o tom, zda jde o geneticky modifikovaný organismus (ÚHUL 2016).

Dochází ke kontrolám sběrů reprodukčního materiálu. Kontrola může probíhat několika způsoby:

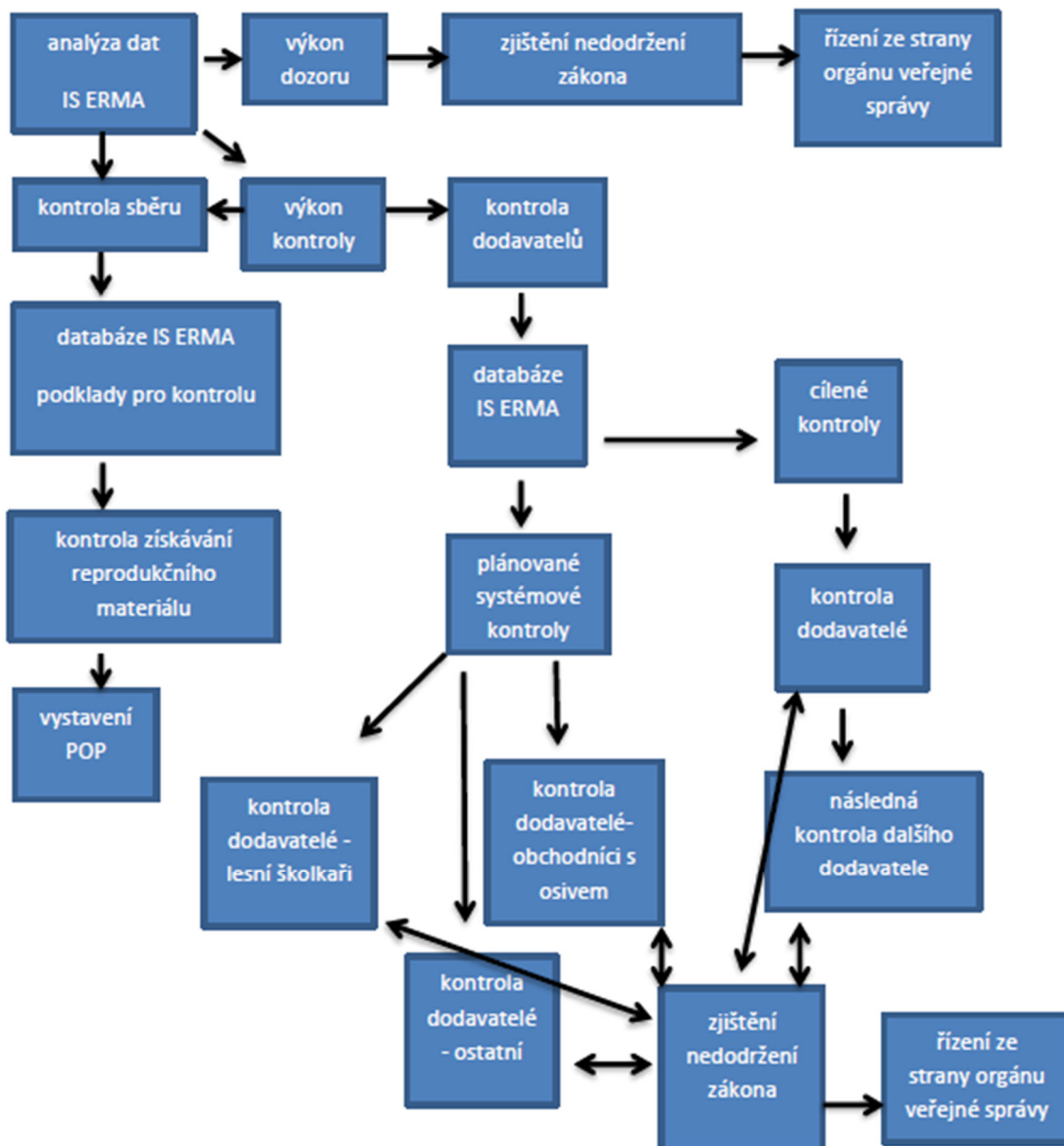
- 1) Úkon předcházející kontrole

Během provedení úkonů předcházejících kontrole pracovník pověřené osoby prověří správnost údajů uvedených v Oznámení o sběru, zejména uznanou jednotku a plánované množství sbíraného reprodukčního materiálu, na základě zjištěných skutečností je rozhodnuto o možném konání kontroly sběru.

## 2) Fyzická kontrola sběru

Pověřená osoba doručí dodavateli Oznámení o zahájení kontroly sběru. Doručení Oznámení mohou a nemusí předcházet úkony předcházející kontrole. Dodavatel je povinen oznámit minimálně 2 pracovní dny předem přesný datum a hodinu sběru tak, aby se pověřená osoba mohla sběru účastnit. Během kontroly musí dodavatel zajistit součinnost; veškerý reprodukční materiál je vážen na kalibrované váze a tento údaj je poté použit v potvrzení o původu.

Další kontrolou je kontrola dodavatelů, kterou lze rozdělit na periodickou - plánovanou (podle typu dodavatele) a cílenou (cílené prověření skutečností na základě získaných indicií). Pro tuto potřebu jsou využívány podklady databází IS ERMA, mimo jiné údaje poskytované jednotlivými dodavateli na základě povinností vyplívající ze zákona a také informace ze vzájemné komunikace mezi členskými zeměmi ES o pohybu reprodukčního materiálu v rámci obchodní výměny mezi zeměmi ES. Cílem kontrol dodavatelů je v první řadě ověřovat údaje o deklarované identitě jednotlivých oddílů reprodukčního materiálu a tím zajistit ochranu spotřebitele – vlastníka lesa (PAŘÍZEK, KOTRLA 2016).



Obrázek 36 Schéma systému kontroly reprodukčního materiálu (ÚHÚL)

## 14. Situace v sousedních zemích

### 14.1. Pravidla přenosu reprodukčního materiálu

Pravidla přenosu reprodukčního materiálu v sousedních zemích určuje Směrnice Rady 1999/105/ES. V podstatě ve všech členských státech Evropské Unie platí stejná pravidla pro přenos reprodukčního materiálu mezi zeměmi. Měly by být dodržena pravidla přenosů v rámci jednotlivých přírodních proveniencí a to v rámci výškových pásem. Vymezení hranic horizontálního přenosu vychází z podobnosti klimatických (v menší míře půdních) podmínek (KRAJMEROVÁ, GÖMÖRY 2017).

V některých oblastech Společenství se stanovují zvláštní požadavky na vnější jakost reprodukčního materiálu některých druhů lesních dřevin z důvodů klimatických a stanovištních podmínek, jedná se o alpské, středomořské nebo severské regiony (SMĚRNICE RADY 1999/105/ES).

Při vývozu reprodukčního materiálu do členských států EU je dodavatel povinen informovat Ústav pro hospodářskou úpravu lesa do 1 měsíce ode dne vývozu na předepsaném formuláři. Dodavatel při vyvážení reprodukčního materiálu z ČR vystavuje průvodní list v souladu s naší legislativou. Pokud dodavatel dováží reprodukční materiál do ČR, informaci o dovozu předává Ústavu pro hospodářskou úpravu lesa příslušná instituce dané země. Potvrzení o původu je po formální stránce řešeno v rámci členských zemí EU jednotnou formou, průvodní listy mají jednotný obsah (MAEUR, PALÁTOVÁ, KOTRLA, 2009).

## 14.2. Kontrolní mechanismy v ostatních zemích

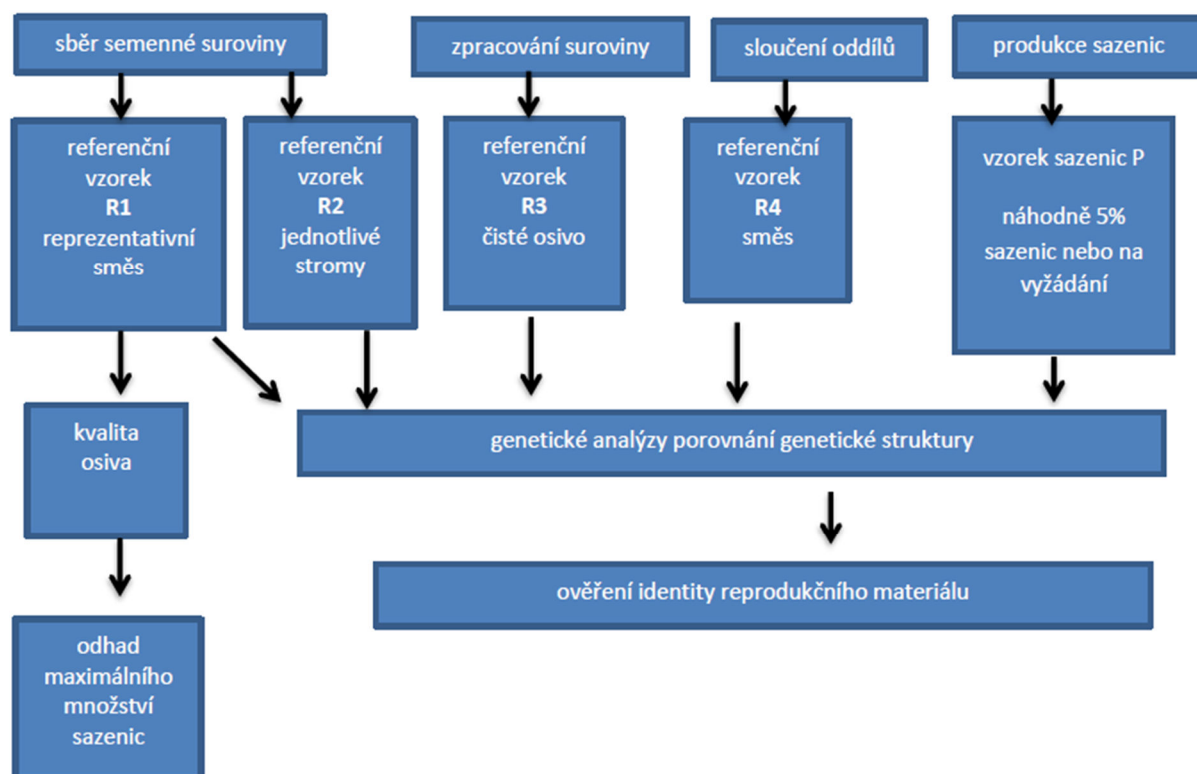
Každá členská země ES je povinna vytvořit takový kontrolní systém, aby v celém průběhu nakládání s reprodukčním materiálem lesních dřevin byla zachována pravdivá identita daného oddílu reprodukčního materiálu (KOTRLA, PAŘÍZEK 2008). Průvodní dokumentace jsou obvykle jediným důkazem o původu reprodukčního materiálu lesních dřevin.

### 14.2.1. Německo

V Německu byl v roce 2002 zaveden ZüF certifikační systém, pomocí kterého je zjišťován původ sadebního materiálu, k jeho ověření jsou využity genetické markery (izoenzymové a DNA analýzy). K ověření identity se porovnávají referenční vzorky osiva získaného v definovaných momentech se vzorky sadebního materiálu z lesních školek. Výhodou lesních školek tedy je, že produkují sadební materiál s ověřeným původem, jehož cena se pohybuje cca o 10 % výše oproti ceně běžného sadebního materiálu. K zavedení ZüF certifikačního systému vedly především pravidelně zfalšované listy, což vedlo k použití nevhodného sadebního materiálu pro danou oblast, s nižším růstem, špatným tvarem, zvýšenou úmrtností nebo zvýšenou náchylností k onemocnění.

Při sběru semenné suroviny je z konkrétního oddílu odebrán buď vzorek z jednotlivých stromů nebo reprezentativní směs suroviny z celého oddílu. Po zpracování oddílu semenné suroviny se z čistého osiva odebírá další referenční vzorek, který pro účely kontroly doplňuje referenční vzorky předchozí. Referenční vzorky osiva jsou uchovány ve skladu po dobu 10 let při teplotě – 20 °C. Ke každému oddílu osiva je přiděleno identifikační číslo a je zařazen do ZüF certifikačního systému. Na výsadbyschopný sadební materiál je certifikační agenturou vydán producentům ZüF certifikát, který dokládá, že je sadební materiál s ověřeným původem (KOTRLA, PAŘÍZEK 2008, KONNERT & RUETZ 2006).





Obrázek 37 Schéma získávání referenčních vzorků dle ZüF (modifikováno podle PAŘÍZKA)

#### 14.2.2. Slovensko

Na Slovensku podle ZÁKONA č. 138/2010 Z. z. dochází ke kontrolám sběru reprodukčního materiálu. Držitel osvědčení, který vykonává sběr semen, semenné suroviny, semenáčků z přirozeného zmlazení nebo částí rostlin k vegetativnímu množení, je povinen nejméně tři dny před plánovaným začátkem sběru oznámit příslušnému okresnímu úřadu začátek a místo sběru. Provádět kontroly může orgán státní správy a orgán státní odborné kontroly v rámci své územní působnosti. V případě uvádění reprodukčního materiálu lesních dřevin na trh mohou kontrolu vykonávat i odborníci z Evropské komise.

Dozor kontroluje:

- a) původ, balení, označení, evidenci, kvalitu reprodukčního materiálu a vykonávání činností s lesním reprodukčním materiálem od jeho získání až po dodávku konečnému odběrateli,
- b) stav a obhospodařování uznaných zdrojů reprodukčního materiálu,
- c) použití stanovištně a geneticky vhodného reprodukčního materiálu na obnovu lesa a zalesňování a na jiné lesnické účely,

- d) genetickou identitu klonů, směsí klonů a multiklonálních variet,
- e) použití reprodukčního materiálu z obchodní výměny a dovozu (ZÁKON č.138/2010 Z. z.).

#### **14.2.3. Polsko**

V Polsku je registrační systém BNL (Buiro Nasiennictwa Leśnego), kde dodavatelé zadávají informace o původu reprodukčního materiálu, oznamují sběr osiva. Podle Dz. U. 2001 NR 73 POZ. 761 mezi obecně dostupné registry patří: registr dodavatelů, Národní registr o původu reprodukčního materiálu lesních dřevin, regionalizace osiva, zprávy o množství sebraného lesního reprodukčního materiálu. Princip je podobný jako v ČR, před zahájením sběru musí držitel licence sběr oznámit ve dvou termínech: měsíc před plánovaným sběrem a 7 dní před plánovaným sběrem. Po sběru producent získá z ministerstva osvědčení o původu. Od roku 2011 - 2035 v Polsku testují původ lesního reprodukčního materiálu borovice lesní, pomocí genetických markerů. V roce 2017 prozkoumaly 258 nově přijatých vzorků z 13 krajských ředitelství státních lesů (PASLAWSKA, BARTKOWIAK 2017).

#### **14.2.4. Maďarsko**

V Maďarsku se nachází kolem 1 000 lesních školek, rozdělených dle velikosti do pěti skupin. Každý rok zaniká 50 – 60 lesních školek a přibližně stejný počet je uváděn do provozu. Kontrola je prováděna inspektorem, jsou vyžadovány doklady o původu osiva, sadby a řízků dle jednotlivých druhů lesních dřevin a grafická evidence lesní školky, vedená dle jednotlivých záhonů a jednotlivých oddílů reprodukčního materiálu. Každý inspektor navštíví během roku všechny přidělené lesní školky. Za provedení kontroly je vybírán poplatek, jehož výše je odvozena od množství zkontrolovaného reprodukčního materiálu. V případě zjištění porušení předpisů jsou udělovány pokuty, které mohou dosáhnout až desetinásobku hodnoty sadebního materiálu, u kterého byly nedostatky zjištěny.

V Maďarsku je pod stálou kontrolou sběr, pěstování, skladování a použití sadebního materiálu včetně dovozu a vývozu. Certifikaci reprodukčního materiálu lesních dřevin provádí Státní zemědělský zkušební ústav na základě osvědčení o původu osiva s ohledem na skutečné ověřené množství a stav, vždy je označen etiketou.

#### **14.2.5. Rakousko**

V Rakousku se využívají genetické markery k ověřování původu osiva, tento proces je zakotven ve formě certifikačního systému BFW (Bundesforschungszentrum für Wald). Kontrola původu sadebního materiálu je považována pro všechny strany v produkčním řetězci za výhodnou. Na kontrolní činnosti se podílí několik partnerských laboratoří, zvláštní pozornost je věnována dubu, borovici, třešním, buku, smrku a topolu (BFW 2018).

## E. Ekonomická část

### 15. Ekonomická analýza

V rámci ekonomické analýzy jsou posuzovány dva přístupy k využívání metodiky ověřování deklarovaného původu.

První varianta vychází z předpokladu, že genetická informace bude generována formou zadání zakázky externí genetické laboratoři. Ostatní fáze ověřování deklarovaného původu reprodukčního materiálu, které nevyžadují specifické přístrojové vybavení (sběr materiálu, následné vyhodnocení genetických dat a stanovení závěru) budou realizovány odbornými specialisty. V této variantě tedy nejsou zahrnuty náklady na sběr vzorků ani mzdy odborných specialistů, což umožňuje srovnání nákladů případné „vlastní“ laboratoře s cenou za genotypizační služby prováděné externí laboratoří.

Druhý přístup zvažuje vybudování akreditovaného pracoviště (laboratoře), které by provádělo veškeré aktivity komplexně. To znamená od odběru vzorků přes extrakci DNA až po genetickou analýzu a stanovení závěru. Pro ekonomickou úvahu byla stanovena míra zisku 30%, která je z pohledu rentability považována za minimální. Požadovaná míra zisku konkrétního podnikatelského subjektu však může být ve volném tržním prostředí výrazně odlišná. V rámci této alternativy byla provedena komplexní nákladová kalkulace na vyhodnocení vzorku. Byly analyzovány předpokládané náklady (na pořízení spotřebního materiálu, mzdové náklady a další náklady potřebné k provozu akreditované laboratoře) a také vybudování a vybavení laboratoře. Následně byly provedeny propočty výnosnosti (rentability) daného podnikatelského záměru včetně analýzy bodu zvratu a doby návratnosti investice.

Porovnání finanční náročnosti bylo provedeno v několika variantách, a to v závislosti na objemu prací a zároveň byly porovnány různé varianty outsourcingu s variantou interního pracoviště na základě objemu zpracovaných vzorků.

Mzdové náklady pracovníků byly kalkulovány dle vnitřního mzdového předpisu České zemědělské univerzity v Praze. Je ale nutno podotknout, že tato tarifní mzda nereflektuje současnou situaci na trhu práce. Pravděpodobnější je proto varianta ujednání smluvní mzdy. Součástí výstupu ekonomické rozvahy (na elektronickém nosiči) je jednoduchý program v MS

Excel, kde lze operativně upravovat hodnoty vstupních nákladových parametrů, tento stav lze tedy zohlednit a získat okamžitý přepočítání všech hodnot a ekonomických ukazatelů.

## 15.1. Prognóza cenového vývoje mikrosatelitových analýz

### Fragmentační mikrosatelitová analýza

Analýza vybraných mikrosatelitových úseků pomocí fragmentačních technik kapilární elektroforézy je doposud standardní a výlučně používanou metodou v aplikovaném výzkumu a praxi. V rovině základního výzkumu se však již objevují úvahy o „převedení“ fragmentační analýzy na platformu nových metod sekvenování.

Podstatou mikrosatelitové fragmentační analýzy je detekce délkového polymorfismu PCR amplikonů. Pro uvedenou analýzu lze efektivně využít sekvenátory starší generace (počínaje rokem výroby cca 2000). Celkové náklady jsou dány především cenou reagensů a cenou lidské práce. U přístupu s využitím elektroforetické separace je předpokládán cenový pokles v horizontu příštích 10 let odhadován v rozmezí 2 – 10 %. Úvaha vychází především z předpokládaného snižování nákladů na vstupní reagentie a spotřební laboratorní materiál a byl kalkulován podle obecného cenového vývoje v minulé dekádě. Vyšší snížení finanční náročnosti se nepředpokládá, jelikož vše bude vyvažováno kontinuálně se zvyšujícími náklady na lidské zdroje. Ilustrativně je uveden cenový rozdíl dvou identických poptávek u společnosti Ecogenics GmbH v letech 2015 a 2018 (tabulka 20).

Tabulka 20 Časový vývoj ceny genotypizace

#### Cenová nabídka společnosti Ecogenics GmbH rok 2015

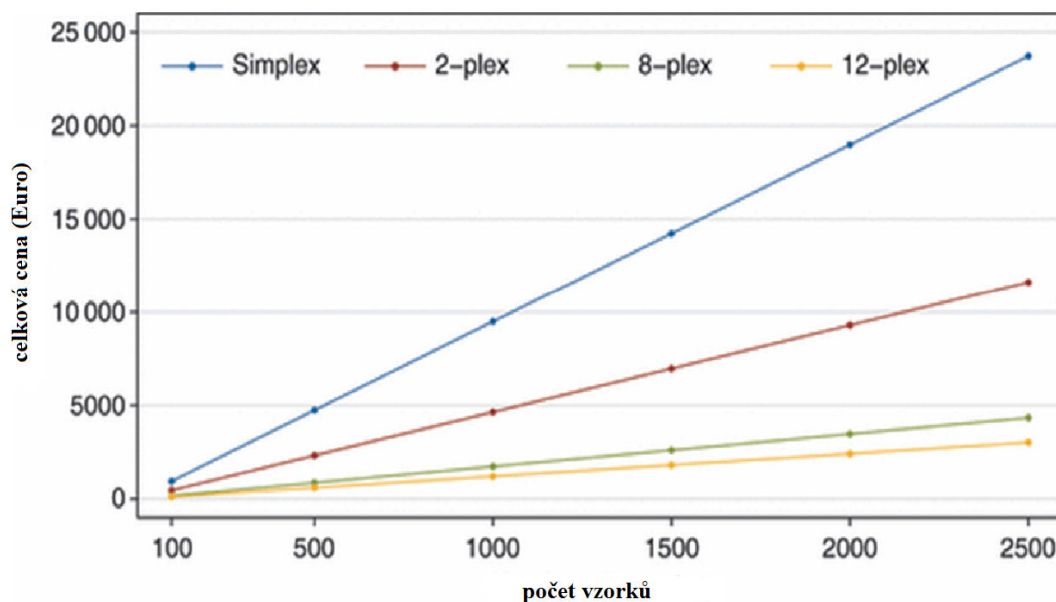
Popis služby	Cena v Kč
DNA pilotní izolace	30 720,-
Syntéza primerů a multiplexová optimalizace	80 640,-
DNA izolace	128 000,-
Genotypizace a odečtení alel	192 000,-
<b>Celkem</b>	<b>431 360,-</b>

#### Cenová nabídka společnosti Ecogenics GmbH 2018

Popis služby	Cena v Kč
DNA pilotní izolace	16 780,-
Syntéza primerů a multiplexová optimalizace	56 832,-
DNA izolace	117 760,-
Genotypizace a odečtení alel	204 800,-
<b>Celkem</b>	<b>396 172,-</b>

Při přepočtu lze hovořit o poklesu nákladů přibližně o 3,3 % ročně. Zajímavá je taktéž změna u jednotlivých položek. Jak je patrné z tabulky 20, dochází k cenovému poklesu u dílčích kroků, kde je rozhodující nákladovou položkou cena reagensů, zatímco cena za činnost s převahou lidské práce (genotypizace a odečtení alel) má vzestupný charakter.

Stěžejní efektivizace finančních nákladů byla provedena v rámci tohoto projektu, a to sestavením multiplexů s maximalizovaným počtem fluorescenčně značených markerů v jedné reakci. Jednotlivé multiplexy obsahují 8 – 16 fluorescenčně značených markerů generujících mikrosatelitové amplikony různých délek. Míra finanční optimalizace je ilustrována pomocí grafu 2.



zdroj: Guichoux et al. 2011, modifikováno

Graf 2 Cenová závislost různých variant multiplexů

Guichoux et al. (2011) uvádí, že již při počtu 100 analyzovaných vzorků je multiplex s 12 markery devětkrát levnější než při analýze za využití samostatných reakcí. Jak je z grafu patrné, se stoupajícím počtem analyzovaných vzorků se rozdíly v absolutních nákladech značně zvyšují.

Mikrosatelity jsou považovány za značně variabilní genetické markery se širokými možnostmi využití v otázkách identifikace, určování původu či rodičovství, genetické diverzity či

inbreedingu. Kromě nesporných výhod oproti jiným genetickým markerům se zde nicméně naráží na některé technické aspekty, které mohou způsobovat obtíže při automatizaci a standardizaci zpracování a analýzy dat. Mezi tato omezení patří především relativně nízký stupeň možné automatizace vyhodnocování dat a komplikovaná standardizace dat mezi jednotlivými platformami či laboratořemi (De Barba et al., 2017). Uvedené limitace jsou způsobeny podstatou získávání dat, kterou je posuzování velikosti amplifikovaných DNA fragmentů pomocí metod kapilární elektroforézy. Další limitací kapilární elektroforézy je pak nutnost vhodného kombinování (multiplexování) omezeného počtu fluorescenčně značených markerů tak, aby byly vzájemně kompatibilní při PCR amplifikaci a při vyhodnocování nevykazovaly délkový překryv shodně fluorescenčně značených fragmentů.

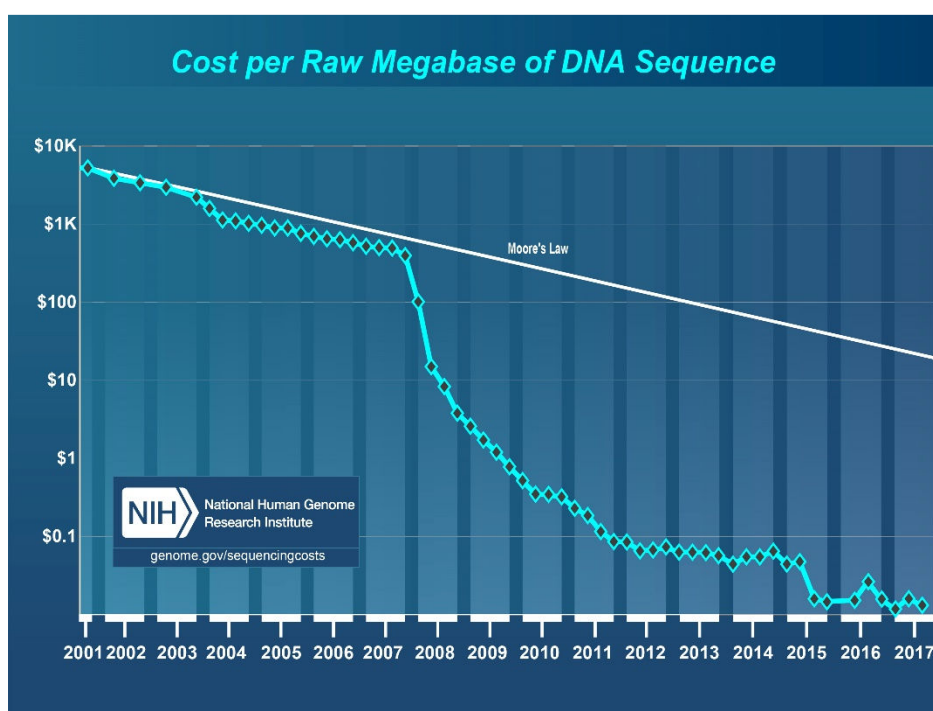
### **Budoucí perspektivy využití moderních vysokokapacitních technologií sekvenování**

Potenciální využití moderních vysokokapacitních technologií sekvenování (Next-generation sequencing - NGS, High-throughput sequencing - HTS) by umožnilo překonat většinu z těchto technických limitujících faktorů. Hlavním přínosem je sekvenace amplifikovaných mikrosatelitových úseků, tudíž může být genotypizace provedena na principu přímého rozlišování jednotlivých bází řetězce. Odpadá tak nepřímé určování velikosti amplifikovaného fragmentu pomocí elektroforetických technik. Výhodou nové techniky je vyšší přesnost při určování alel (kromě informace o délce fragmentu je známa také jeho přesná sekvence), na vyhodnocení dat nemají vliv podmínky konkrétního experimentu. Jelikož alely mohou být v tomto případě chápány jako spojitá řada genomických dat, proces genotypizace se může stát plně automatizovaným bioinformačním procesem nezávislým na platformě, pomocí které byla data získána. Informace, která bude o mikrosatelitových lokusech pomocí sekvenace získána, je maximálně informativní. Prvními experimentálními studiemi byla již prakticky ověřena funkčnost a perspektiva tohoto přístupu (Vartia et al., 2016; De Barba et al., 2017; Carroll et al., 2018). Autoři jako další výhodu nové metody uvádějí také nižší požadavky na kvalitu a množství vstupního genetického materiálu. Pragmatickým omezením při implementaci nové metody je značná finanční náročnost na vybudování adekvátních genomických laboratoří. Toto však lze řešit, a je to poměrně běžné, více článkovým procesem zpracování a analýzy dat, kdy je specifická část genetických analýz prováděna vysoce specializovanou genomickou laboratoří. Vhodné parametry sekvenace (délku čtecího rámce a hloubku čtení) je nutno



experimentálně ověřit. Značné úsilí bude třeba věnovat také vytvoření bioinformatické platformy zpracování dat. De Barba et al. (2017) uvádějí předpokládanou úsporu nákladů oproti konvenčnímu zpracování pomocí kapilární elektroforézy kolem 40 %, nezmiňují však počet zvažovaných markerů ani počet vzorků.

Je podstatné zdůraznit, že případnou změnou platformy při generování mikrosatelitových dat dojde k zásadní metodické změně. Nepřímá délková analýza mikrosatelitového amplikonu (metoda kapilární elektroforézy) by byla nahrazena informací o pořadí jednotlivých nukleotidů (metoda NGS, HTS). Pro představu dosavadního a předpokládaného cenového vývoje sekvenování lze vyjít z údajů Národního institutu pro výzkum lidského genomu (National Human Genome Research Institute, <https://www.genome.gov/>).



Graf 3: Cenový vývoj na sekvenování 1 Mbp lidského genomu

zdroj [https://www.genome.gov/images/content/costpermb\\_2017.jpg](https://www.genome.gov/images/content/costpermb_2017.jpg)

Graf 3 zobrazuje změnu finanční náročnosti na osekvenování 1 Mbp lidského genomu. Za posledních 15 let došlo ke snížení nákladů na sekvenování genomu zhruba 100 000 krát. Do roku 2007 lze v grafu vyzorovat korelaci s empirickým Moorovým zákonem exponenciálního poklesu nákladnosti. Na počátku roku 2008 došlo k výraznému odchýlení od tohoto pravidla a v následujících čtyřech letech k obrovskému cenovému poklesu nákladů. Tento zlom byl způsoben zavedením nových metod sekvenování (NGS), které nahradily doposud používanou

Sangerovu metodu. Mezi lety 2015 - 2017 nastává oscilace kolem dosavadního minima, která je způsobena započítáváním nákladů na údržbu a modernizaci sekvenátorů u konsorcia NIH. Z výše popsaného průběhu lze však vyvodit zobecněné trendy:

- 1) Do budoucna nelze ani u nových metod sekvenování již očekávat extrémní cenový propad. Data generovaná při stejné ceně ale budou robustnější a se snižující se mírou chybovosti.
- 2) Míra automatizace se přiblížila maximu, zvyšující se cena lidských zdrojů bude zpomalovat snižování finanční náročnosti.
- 3) Existuje zde faktor nepredikovatelného a aktuálně neočekávaného budoucího vývoje. Tím je objev jiné, výrazně efektivnější platformy sekvenování, která by přinesla obdobný zlom jako v roce 2008.

Nicméně jako perspektivní krok k dalšímu snižování finanční náročnosti genetické analýzy se v současnosti jeví přechod na platformu NGS, jelikož oproti klasickým fragmentačním technikám ještě nedosáhla svého technického limitu.

## 15.2. Externí genetická laboratoř

Trh genetických laboratoří se dá rozdělit na dva hlavní proudy. Prvním a zároveň dominantním proudem jsou genetické laboratoře zabývající se obecně řečeno živočišnou genetikou. Do tohoto proudu spadají laboratoře zabývající se genetikou člověka, dědičností chorob, farmaceutickým výzkumem atd. Toto odvětví je výrazně dominantní stránkou trhu. Je možné zde nalézt jak státní, tak soukromé výzkumné laboratoře a společnosti nabízející celou řadu služeb od mapování genetického původu, přes vrozené vady a náchylnosti k nemocem až po podporu výzkumu a testování laboratorních zvířat. Částečný přehled registrovaných laboratoří je dostupný například na stránkách registru genetického testování (Genetic Testing Registry- GTR), který sdružuje informace a kontakty o laboratořích po celém světě (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/>) nebo Databáze genetických pracovišť (SLG), která sdružuje přehled genetických pracovišť registrovaných v ČR viz. (<https://new.slg.cz/pracoviste/#>).

Odvětví genetického testování je velmi rozsáhlé a rychle expanduje, a to nejen v České Republice, ale i ve světě. Je to díky velkému finančnímu potenciálu, který láká stále nové zájemce ke vstupu na trh. V dnešní době globalizace je zadávání zakázek do zahraničí mnohdy výhodnější a rychlejší než jejich realizace v ČR.

Druhým proudem je rostlinná genetik. V České Republice se již nejedná o tak rozšířený trh. Většina genetických laboratoří, které se zabývají rostlinou genetikou je zaměřena na genetiku a šlechtění potravinářsky významných druhů, čemuž jsou přizpůsobeny pracovní postupy a akreditované programy laboratoří jako například u laboratoří Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v.v.i. Genetikou dřevin se pak zabývají především laboratoře spadající pod výzkumné instituce, vysoké školy (lesnické fakulty ČZU a Mendelu; přírodovědecké fakulty UK, Masarykovy univerzity, JČU), botanický ústav, či akademii věd. Tato zařízení jsou často specializovaná a slouží především pro vědu a výzkum v rámci instituce.

Rozsáhlejší síť soukromých laboratoří, poskytujících námi hledaný balík služeb můžeme nalézt ve světě. Hlavním těžištěm jsou laboratoře nacházející se v USA. Ty se často vyznačují vyššími náklady na realizaci. Na evropském kontinentě je stejně tak možné nalézt sérii laboratoří, a to především v zemích západní Evropy. Tyto laboratoře poskytují odpovídající služby a často disponují mezinárodně uznávanou akreditací. Využitím těchto laboratoří se zkracuje a

zjednodušuje doprava materiálu ke zpracovateli. Nejlevnější ceny na rozbor vzorků jsou pak často nabízeny v asijských zemích, jako je Indie, Čína, Japonsko, Korea atd. Tato skutečnost je dána především nižšími náklady na pracovní síly, které často tvoří hlavní nákladovou položku výroby.

#### **15.2.1. Náklady na genetické analýzy formou služby**

Pro zjištění cen genetických laboratoří byla vytvořena fiktivní poptávka. Požadavkem bylo ze zaslaných vzorků (dormantní pupeny smrku) izolovat DNA a ve dvou optimalizovaných multiplexech provést mikrosatelitovou fragmentační analýzu na 15 lokusech pro 500 vzorků.

Je nutné předpokládat, že dle těchto kritérií byla u poptávaných subjektů kalkulována cena za jednotku a je možné, že tato cena by mohla v určitém intervalu kolísat podle objemu zakázky. Při objemnější zakázce by bylo možné předpokládat, že s růstem počtu vzorků dojde ke snížení nákladů na jeden analyzovaný vzorek, a to zejména důsledkem rozpuštěním části fixních nákladů na větší počet vzorků. Stejně tak při menší zakázce můžeme předpokládat růst nákladů na jeden analyzovaný vzorek. Dále je možné uvažovat, že navázání dlouhodobé spolupráce s určitým pracovištěm může pozitivně ovlivnit výši ceny.

Byla poptána řada předem vytipovaných subjektů (zařazeno bylo 5 subjektů), u kterých byl předpoklad získání reprezentativních nabídek a odhadu časové doby potřebné pro zpracování celé analýzy. Záměrně byly vybrány subjekty z různých částí světa. Cenové nabídky byly přepočteny z původní měny na českou korunu. Převodní koeficient byl stanoven dle kurzu devizového trhu ČNB pro polovinu roku 2018 (průměrné hodnoty duben až červen):

- Kurz EU ku Kč: 1 EU = 25,60 Kč
- Kurz USD ku Kč: 1USD = 21,50 Kč

## Představení jednotlivých firem a jejich cenové nabídky

1. **Ecogenics GmbH** – je dceřiná společnost Microsynth AG, se sídlem ve Švýcarsku, která působí na trhu již více než 14 let. Jedná se o společnost s velmi dobrým jménem, která bývá hojně využívána pro podporu vědecké činnosti především pro vysokou kvalitu poskytovaných služeb. Jejich cílem je budování pevné dlouhodobé spolupráce jak s vědeckými institucemi, tak se soukromým sektorem. Další informace jsou dostupné na stránkách společnosti: <http://www.ecogenics.ch/index.html>.

Cenová nabídka činila **396 172 Kč bez DPH (15 475.50 €)**. Díky detailně zpracované nabídce laboratoře bylo možné oddělit fixní a variabilní náklady na zakázku a zpřesnit tak odhad cenového vývoje při navýšení počtu poptaných analýz. Detailnější rozpis jednotlivých úkonů je uveden v tabulce 21.

Tabulka 21 Cenová nabídka společnosti Ecogenics GmbH

Popis služby	Cena v Kč
DNA pilotní izolace	16 780,-
Syntéza primerů a multiplexová optimalizace	56 832,-
DNA izolace	117 760,-
Genotypizace a odečtení alel	204 800,-
<b>Celkem</b>	<b>396 172,-</b>

Součástí nabídky byl zároveň i podrobný časový harmonogram, který definuje předpokládanou dobu provedení analýzy. Celková doba potřebná pro analýzu je odhadována na období cca 12 až 20 týdnů.

2. **CD Genomics** – je americká soukromá společnost založena kolem roku 2004, s ústředím v New Yorku nabízející celou řadu služeb v oblasti genetiky. Služby jsou dodávány ve vysoké kvalitě a mohou být přizpůsobené dle požadavků zadavatele. Spolupracují jak s farmaceutickými či biologickými organizacemi, a to jak státními či akademickými institucemi. Další informace jsou dostupné na stránkách společnosti: <https://www.cd-genomics.com>

Zaslaná cenová nabídka na genetickou analýzu 500 vzorků dosahuje **celkových nákladů 272 298 Kč bez DPH (12 665 \$)**. Detailnější rozpis jednotlivých úkonů je uveden v tabulce 22.

Tabulka 22 Cenová nabídka společnosti CD Genomics

Popis služby	Cena v Kč
DNA extrakce	91 375,-
Syntéza primerů	24 188,-
Multiplexová optimalizace	25 800,-
PCR amplifikace	60 952,-
Sekvenace a odečtení alel	69 983,-
<b>Celkem</b>	<b>272 298,-</b>

Součástí nabídky byl zároveň i časový harmonogram, který uvádí předpokládanou dobu provedení analýzy. Celková doba potřebná pro analýzu je odhadována na období cca 4-5 týdnů pro zpracování všech 500 vzorků.

3. **AIT Austrian Institute of Technology GmbH** – je rozsáhlá vědecká společnost a největší výzkumná vědecko-technická organizace v Rakousku. Je z dominantní části vlastněná státem a zaměstnává více než 1 300 zaměstnanců. Zabývá se výzkumem nových technologií a podporou průmyslu a výzkumných institucí. Jeho výzkum probíhá v celé řadě odvětví. Jedním z nich je i sekce přírodních zdrojů a zdraví, s laboratořemi pro výzkum rostlin. Další informace jsou dostupné na stránkách společnosti: <https://www.ait.ac.at/en/>

Zaslaná cenová nabídka, která byla předložena, dosahuje **celkových nákladů (cca 1 154 560 Kč DPH (45 100 €))**. Detailnější rozpis jednotlivých úkonů je uveden v tabulce číslo 23.

Tabulka 23 Cenová nabídka společnosti AIT Austrian Institute of Technology GmbH

Popis služby	Cena v Kč
DNA extrakce a kontrola kvality	64 000,-
PCR a kontrola kvality	384 000,-
Úprava a genotypizace	480 000,-
Analýza	226 560,-
<b>Celkem</b>	<b>1 154 560,-</b>

Součástí nabídky byl zároveň i časový harmonogram, který uvádí předpokládanou dobu provedení analýzy. Celková doba potřebná pro analýzu je odhadována na období cca 12 až 14 týdnů.

**4. Eurofins Genomics GmbH** – je uskupení s centrálou v Německu, jenž bylo založeno v roce 1990 jako součást Eurofins Scientific Group, vědeckou společností, jenž disponuje 44 laboratořemi a více jak 38 000 zaměstnanci po celém světě. Jejich společnost je zaměřena na celou řadu odvětví a dlouhodobě poskytuje služby vědeckým i technickým institucím. Nabídka společnosti zahrnuje celou řadu genetických služeb včetně schopnosti budování a testování nových markerů.

Cenová nabídka, která byla předložena, dosahuje **celkových nákladů 326 400 Kč bez DPH (12.750 €)**. Detailnější rozpis jednotlivých úkonů nebyl dodán, tudíž nebylo možné stanovit jednotlivé nákladové položky.

Součástí nabídky byl zároveň i časový harmonogram, který uvádí předpokládanou dobu provedení analýzy. Celková doba potřebná pro analýzu je odhadována na období cca 6 až 8 týdnů.

**5. BEX CO., LTD.** – je japonská společnost založena v roce 1990 v Tokiu. Disponuje jednou z předních vědeckých laboratoří Japonska s 20 vědeckými pracovníky a zaměřuje se na poskytování genetických služeb a výzkumem a konstrukci nových zařízení sloužících ke genetické analýze.

Cenová nabídka, která byla předložena, je v celkové výši **614 400 Kč bez DPH (24 000 €)**. Detailnější rozpis jednotlivých úkonů byl dodán, ve zkrácené formě:

Tabulka 24 Cenová nabídka společnosti BEX CO., LTD.

Popis služby	Cena v Kč
Extrakce DNA	230 400,-
SSR analýza	384 000,-
<b>Celkem</b>	<b>614 400,-</b>

Součástí nabídky byl zároveň i časový harmonogram, který definuje předpokládanou dobu provedení analýzy. Celková doba potřebná pro analýzu je odhadována na období cca 14 až 16 týdnů.

### 15.2.2. Porovnání jednotlivých nabídek

Mezi cenovými nabídkami jednotlivých společností lze pozorovat významné rozdíly. Nejnižší cenová nabídka (CD Genomics) je zhruba čtvrtinová v porovnání s nejdražší nabídkou (AIT). Tento výrazný cenový rozdíl ilustruje, že nastavená míra zisku jednotlivých firem je v tržním prostředí značně variabilní.

Tabulka 25 Porovnání nabídek

Společnost	Cena celkem v Kč (bez DPH)	Časová náročnost
Ecogenics GmbH	396 172	12-20 týdnů
CD Genomics	272 298	4-5 týdnů
Austrian Institute of Technology GmbH	1 154 560	12-14 týdnů
Eurofins Genomics	326 400	6-8 týdnů
BEX CO., LTD	614 400	14 – 16 týdnů

Nejlevněji a za nejkratší dobu bude genetická analýza hypotetické poptávky 500 vzorků provedena ve společnosti **CD Genomics**, která má sídlo v USA. Jelikož šlo o hypotetickou poptávku bez zájmu její realizace, nebyly firmy již opětovně kontaktovány. U vyšších cenových nabídek lze předpokládat prostor pro diskuzi o možné slevě.



### 15.3. Samostatný podnikatelský subjekt pro komplexní ověřování deklarovaného původu reprodukčního materiálu

Podnikatelským záměrem je zřízení subjektu pro komplexní proces genetické analýzy reprodukčního materiálu zahrnující sběr, extrakci a analýzu DNA, vyhodnocení výsledků a zhotovení odborného posudku. Pro ekonomickou rozvahu byla zvolena 30% míra zisku. Právní forma podnikání bude realizována jako společnost s ručením omezeným (s.r.o.), dle kritérií a podmínek uvedených v zákoně č. 90/2012 Sb., tedy zákon o obchodních společnostech a družstvech (zákon o obchodních korporacích).

Genetická laboratoř bude samostatný podnikatelský subjekt nabízející jak dílčí úkony (izolace DNA, genotypizace bez interpretace výsledků), tak komplexní zpracování tzv. na klíč. Pracoviště se bude zabývat sběrem vzorků pro určení genetického profilu, extrakcí a analýzou DNA, vyhodnocováním dat a zhotovováním posudků projektu.

Cílovou skupinou zákazníků jsou velké hospodářské společnosti a vědecké instituce. Případné rozšíření služeb s sebou nese další náklady v podobě vyššího zatížení pracovníků případně navýšení stavu pracovníků, nutností rozdělení nových pracovních úkonů, většího administrativního zatížení atd. Všechny tyto vlivy je případně nutné při rozhodování o expanzi společnosti vzít v potaz.

Umístění genetické laboratoře musí reflektovat několik kritérií. V rámci projektu je uvažováno o vybudování kompletního nového pracoviště. Náklady na pořízení takového pracoviště se mohou bez přesnějších kritérií výrazně lišit. Cena se odvíjí od otázky koupě či vlastnictví pozemku pro zbudování pracoviště, určení objemu práce/ počtu zaměstnanců pracoviště, průměrnými mzdovými náklady v daném regionu, vlastnostmi lokality, dostatkem vhodných pracovníků s odpovídajícím vzděláním a schopnostmi, situací stavebního odvětví v daném regionu atd.

Jistě se dá říct, že zřízení nové laboratoře je značně finančně náročná operace. Je nutné dodržení kritérií, které nezbytně provázejí vybudování nové laboratoře. Kromě základních stavebních norem je nutné zahrnout také speciální nároky na pracoviště, která jsou definována dle normy ČSN 01 8003 *Zásady pro bezpečnou práci v chemických laboratořích*. Na základě této normy je patrné, že přestavba objektů na laboratoř může být finančně náročnější nežli zbudování nové stavby, a to především v důsledku podmínek kladených na bezpečnost a

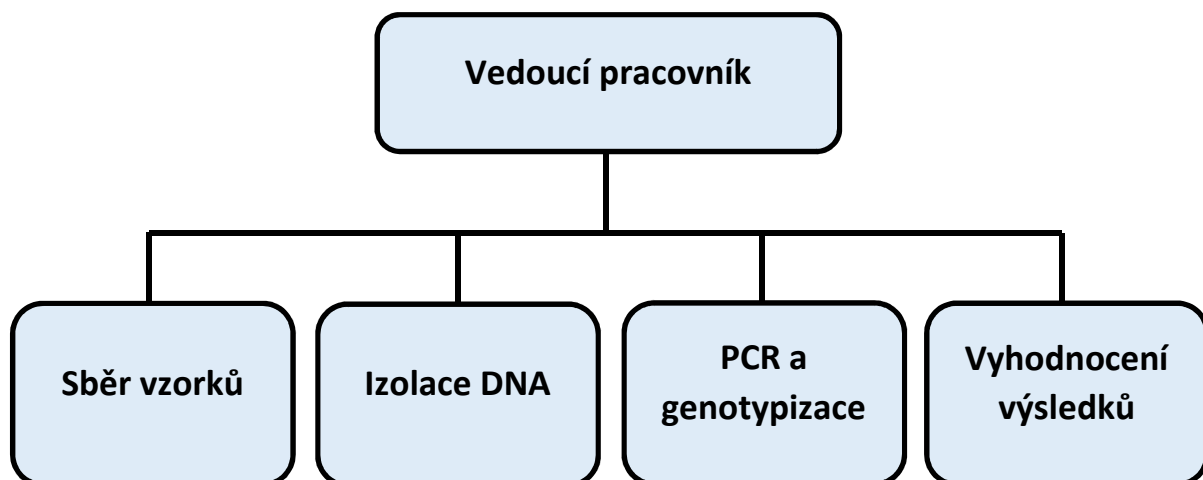
ochranu pracovníků (únikové trasy, vzducho instalace, zajištění prostoru pro práci s chemikáliemi, speciální rozvody sítí a jejich odpovídající značení atd.) a na ochranu životního prostředí.

Samotný proces začíná sběrem genetického materiálu v terénu a doručení materiálu pro extrakci DNA do laboratoře. Vhodným materiálem jsou pupeny, mladé listy či výhonky (vegetačně nejmladší části rostliny). Sběr vzorků v terénu bude proveden proškoleným pracovníkem (laborant). Materiál musí být transportován v uzavíratelných ZIP sáčkách s průvodní dokumentací a ošetřený proti degradaci (zamražení, vysušení). Následuje proces analýzy v laboratoři skládající se z izolace DNA, PCR reakce, genetická typizace a vyhodnocení výsledků. Následně je možné provést vyhodnocení, zhotovení posudku a poskytnout zpětnou vazbu.

### 15.3.1. Organizační struktura subjektu a pracovní pozice

V čele pracoviště, jehož založení je předmětem podnikatelského záměru, stojí vedoucí pracovník. Pod vedoucího pracovníka spadají jednotlivé sekce laboratoře, které zahrnují oddělení vykonávající sběr vzorků, izolace DNA, proces PCR, proces sekvenace a proces vyhodnocování výsledků. Běžně se u takto jednoduchých podniků vyskytuje sekce administrativní činnosti, která zabezpečuje evidenci, faktury, výplaty atd. V tomto případě tyto základní administrativní úkony vykonává současně vedoucí pracovník. Účetní pracoviště je řešeno externě formou poskytované služby účetní společností.

#### Organizační struktura subjektu



## Pracovní pozice

### **a) Vedoucí pracovník**

Pracovní náplň na pozici vedoucího pracovníka zahrnuje školení pracovníků, kontrolu pracovníků na pracovišti, odborný dohled na pracovní postupy, zajišťování nákupu materiálu, kontroly stavu vybavení laboratoře, základní administrativní úkony, základní účetní evidenci a dohled na vyhodnocování vzorků a kontrolu zpracovaných posudků a další administrativní úkony.

Vedoucí pozice je náročná na vůdčí a motivační schopnosti, s důrazem na systém a pořádek. Stejně tak je nutnost orientace v akademickém prostředí se schopností čerpání vědeckých informací z různých zdrojů. Pro její vykonání je nutná odborná způsobilost, podmíněná dosažením vyššího vysokoškolského vzdělání (magisterský program) a praxe v oboru, nebo dlouhodobou praxí v oboru, a to v rozsahu alespoň pěti let. Dále je nutnou podmínkou pro obsazení této pozice schopnost komunikace v anglickém jazyce na úrovni C1 a více, a to jak v mluvené, tak v psané formě. Toto kritérium je dáno tím, že publikace či mezinárodní komunikace mezi dodavateli probíhá prakticky výhradně v anglickém jazyce.

Finanční ohodnocení dané pozice bylo odvozeno na základě vnitřního mzdového předpisu ČZU pro pozici vedoucí laboratoře/ ředitel (11. mzdová třída) ohodnoceným **měsíční super hrubou mzdou 29 104,80 Kč**. Zároveň je v platu zahrnut **příplatek za vedení pracovní skupiny** (skupina do počtu 10 osob), který činí **1 600 Kč**. Dále je zde osobní složka platu v rámci množství zpracovaných dat a vytvoření posudků, a to v hodnotě **116,42 Kč** za vyhodnocený vzorek. Na základě tohoto výběru byly následně kalkulovány výkony pracovních skupin v počtu 9 osob, aby nebylo nutné měnit hodnotu příplatku za vedení pracovních skupin.

### **b) Terénní pracovník – sběr vzorků**

Pozice zahrnuje vyhledávání lokalit, sběr, třídění, evidenci a přepravu vzorků z terénu do laboratorního pracoviště.

Podmínkou pro vykonávání této pozice je vzdělání v lesnickém oboru případně nižší vysokoškolské vzdělání v oboru (bakalářský studijní program) či víceletá praxe v oboru. Důraz

je kladen především na samostatnost a detailní práci. Důležitá je správná evidence a vzorků po celou dobu přepravy ze stanoviště do laboratoře.

Finanční ohodnocení dané pozice bylo odvozeno na základě vnitřního mzdového předpisu ČZU pro pozici laborant (9. mzdová třída) ohodnoceným **měsíční super hrubou mzdou 22 739,80 Kč.**

### **c) Laborant**

Pozice laboranta zahrnuje provádění genetické analýzy a samostatné provádění základních laboratorních úkonů.

Podmínkou pro vykonávání této pozice je buďto vysokoškolské vzdělání v oboru (bakalářský studijní program) či víceletá praxe v oboru. Dále pak nutnost znalosti anglického jazyka na úrovni B2. Toto kritérium je dáno nutností porozumění anglicky psaným postupům pro jednotlivé kity sloužící ke genetické analýze, a dále ke schopnosti práce s odbornými analytickými programy, které jsou psány v anglickém jazyce.

Finanční ohodnocení dané pozice bylo odvozeno na základě vnitřního mzdového předpisu ČZU pro pozici laborant (9. mzdová třída) ohodnoceným **měsíční super hrubou mzdou 22 739,80 Kč.**

### **d) Analytik – zpracovatel posudků (11. mzdová třída)**

Pracovní náplň na pozici hodnotitel analýzy zahrnuje, komunikaci se zadavatelem zakázky, zadáváním úkolů, kontrolu pracovníků na pracovišti, odborný dohled na pracovní postupy, dohled na vyhodnocování vzorků, zpracovávání vzorků, zhotovení posudku a průběžné předávání výsledků.

Pozice hodnotitele analýzy je relativně náročná na zodpovědnost a samostatnost, s důrazem na systém a pořádek. Stejně tak je nutnost orientace v akademickém prostředí se schopností čerpání vědeckých informací z různých zdrojů. Pro její vykonání je nutná odborná způsobilost, podmíněná dosažením vyššího vysokoškolského vzdělání (magisterský program) a praxe v oboru, nebo dlouhodobou praxí v oboru, a to v rozsahu alespoň pěti let. Dále je nutnou

podmínkou pro obsazení této pozice schopnost komunikace v anglickém jazyce na úrovni C1 a více, a to jak v mluvené, tak v psané formě. Toto kritérium je dáno tím, že publikace či mezinárodní komunikace mezi dodavateli probíhá prakticky výhradně v anglickém jazyce.

Finanční ohodnocení dané pozice bylo odvozeno na základě vnitřního mzdového předpisu ČZU pro pozici vedoucí pracovník (11. mzdová třída) ohodnoceným **měsíční super hrubou mzdou 29 104,80 Kč.**

#### e) Uklízečka

V rámci kalkulace byla do sekce správní režie také zanesena pozice uklízečky. Předpokládaná pracovní vytiženost dané pozice je však započtena jen jako poloviční úvazek. Náplní práce jsou základní úkony jako běžný úklid, zametání, utírání prachu, větrání místností, vynášení odpadků, čištění nábytku a zařízení, čištění kobereců vysavačem, vytírání podlah například PVC podlah a dlaždic atd.

Finanční ohodnocení dané pozice bylo odvozeno na základě vnitřního mzdového předpisu ČZU pro pozici uklízečka na **poloviční úvazek** je ohodnocený **měsíční super hrubou mzdou 5 494,00 Kč.**

Tabulka 26 Přehled jednotlivých mzdových nákladů

Pracoviště	Měsíční hrubá mzda	Pohyblivá složka	Mzdový příplatek	Měsíční super hrubá mzda	Roční mzda
Sběrač vzorků (9. mzdová třída)	16 970,00 Kč	0,00 Kč	100 %	22 739,80 Kč	272 877,60 Kč
Laborant (9. mzdová třída)	16 970,00 Kč	0,00 Kč	100 %	22 739,80 Kč	272 877,60 Kč
Hodnotitel analýzy (11. mzdová třída)	20 620,00 Kč	0,00 Kč	100 %	27 630,80 Kč	331 569,60 Kč
Vedoucí laboratoře (11. mzdová třída)	20 620,00 Kč	1 600,00 Kč	150 %	44 662,20 Kč	535 946,40 Kč
Uklízečka (poloviční úvazek)	4 100,00 Kč	0,00 Kč	100 %	5 494,00 Kč	65 928,00 Kč

### **15.3.2. Rozpočet dlouhodobého a oběžného majetku**

#### **1) výstavba laboratoře**

V rámci podnikatelského záměru byla specifikována přibližná užitná rozloha budovy a její rozdělení dle pracovišť, kanceláří a zázemí, které je dále ovlivněno akreditačními předpisy a požadavky na jednotlivá pracoviště. Na základě těchto podmínek byl vyhledán odpovídající půdorys budovy a byl proveden kvalifikovaný odhad u několika stavebních subjektů na cenu výstavby, včetně reflektování veškerých kritérií ČSN 01 8003 a zabudování potřebného statického vybavení laboratoře. Odhadnuté výdaje na stavbu se pohybují okolo **7 000 000 Kč**.

Je zde nutné brát v úvahu, že tato částka se může výrazně změnit dle regionu (cena může růst), či případně při vybrání zhotovitele stavby pomocí veřejné soutěže (cena může klesnout).

#### **2) vybavení laboratoře**

Pokud disponujeme prostory, které splňují kritéria dle normy ČSN 01 8003 a odpovídají laboratorním požadavkům (rozvody el. energie, vody, bezpečnostní odvětrávání atd.), můžeme přistoupit k přístrojovému vybavení laboratoře.

Potřebné vybavení laboratoře lze rozdělit na tři základní skupiny dle fáze procesu, ve které se užívají:

1. Uchování a extrakce DNA
2. Proces PCR a sekvenace
3. Softwarové vyhodnocení

#### **Přístrojové vybavení**

Přístroje potřebné pro laboratorní úkony byly určeny dle laboratorních protokolů a praktického vyhodnocení v rámci činnosti laboratoře. Na základě těchto pozorování byl určen potřebný počet jednotlivých přístrojů. Z volně dostupných zdrojů byla zjištěna pořizovací cena jednotlivých položek. Celkové výdaje na nákup majetku činí **5 064 754,00 Kč** z toho 4 955 464,00 Kč činí položky dlouhodobého hmotného majetku, 109 290,00 Kč činí oběžný majetek a 72 000,00 Kč činí dlouhodobý nehmotný majetek. Podrobná tabulka včetně internetových

odkazů na výrobce/prodejce jednotlivých položek lze nalézt v elektronické příloze Ekonomická kalkulace.

Tabulka 27 Rozpis dlouhodobého hmotného a oběžného majetku

<i>Dlouhodobý hmotný majetek</i>	Počet	Jednotka	Cena/kus	Cena celková
Oscilační mlýnek	1	ks	234 500,00 Kč	234 500,00 Kč
Termoshaker	1	ks	51 500,00 Kč	51 500,00 Kč
Termoblok	1	ks	12 670,00 Kč	12 670,00 Kč
Výrobník ledu	1	ks	89 990,00 Kč	89 990,00 Kč
Centrifuga	1	ks	86 100,00 Kč	86 100,00 Kč
Mikrocentrifuga	1	ks	135 000,00 Kč	135 000,00 Kč
Nano drop	1	ks	245 400,00 Kč	245 400,00 Kč
Lednice	1	ks	36 549,00 Kč	36 549,00 Kč
Mrazák	1	ks	82 755,00 Kč	82 755,00 Kč
Autoklav	1	ks	123 500,00 Kč	123 500,00 Kč
Termocykler	1	ks	197 500,00 Kč	197 500,00 Kč
Sekvenátor	1	ks	3 600 000,00 Kč	3 600 000,00 Kč
Počítačová sestava	3	ks	20 000,00 Kč	60 000,00 Kč
			<b>Suma</b>	<b>4 955 464,00 Kč</b>
<i>Oběžný majetek</i>	Počet	Jednotka	Cena/kus	Cena celková
Opakovací dávkovač (repeater)	1	ks	8 700,00 Kč	8 700,00 Kč
Sada nastavitelných pipet	8	ks	8 300,00 Kč	66 400,00 Kč
Vortex	1	ks	4 490,00 Kč	4 490,00 Kč
Stojan na pipety	2	ks	3 250,00 Kč	6 500,00 Kč
Multikanálová pipeta	1	ks	23 200,00 Kč	23 200,00 Kč
			<b>Suma</b>	<b>109 290,00 Kč</b>

V rámci kalkulace nákladů na spotřební materiál (položka zásoby v rozvaze), jsme určili celkovou částku potřebnou na pořízení **drobného hmotného majetku ve výši 109 290,00 Kč.**

### Dlouhodobý nehmotný majetek

Pro třetí fázi analýzy, tedy vyhodnocení, je zapotřebí zakoupení odpovídajícího softwaru. Byl zvolen software **GeneMarker** (pořizovací cena 72 000 Kč), který poskytuje data v námi preferované formě a pořizovací cena je nižší než u konkurenčních vyhodnocovacích programů.

Tabulka 28 Rozpis dlouhodobého nehmotného majetku

<b>Dlouhodobý nehmotný majetek (Software)</b>	<b>Počet</b>	<b>Jednotka</b>	<b>Cena/kus</b>	<b>Cena celková</b>
GeneMarker	1	ks	72 000,00 Kč	<b>72 000,00 Kč</b>

<b>Majetek laboratoře celkem</b>	<b>5 136 754,00 Kč</b>
----------------------------------	------------------------

### Financování majetku

Pro založení podniku je nutný počáteční vklad v hodnotě **12 336 754,00 Kč**. Tato částka zahrnuje technické vybavení laboratoře (5 136 754,00 Kč), stavbu nové budovy laboratoře (7 000 000 Kč), potřebný oběžný majetek (109 290,00 Kč) a částku peněžních prostředků (200 000 Kč) nutných ke krytí potřebných výdajů v počáteční fázi produkce (výplaty, nákupy nepřímého oběžného majetku, proplácení drobných výdajů, cestáky, opravy atd.)

Vstupní investice bude plně hrazena podnikatelským úvěrem. Roční úrok byl stanoven na hodnotě 3,07 % a to na základě průměrných úrokových hodnot uvedených ve zprávě ČNB pro období říjen 2018 pro nefinanční podniky s obratem 7,5 až 30 mil. Kč.

### Rozvaha

Simulační rozvaha byla sestrojena pro konec prvního účetního období (jeden rok).

**Aktiva** dosahují částky **12 336 754,00 Kč** a jsou tvořena částkou 12 027 464,00 Kč za dlouhodobý hmotný majetek a částkou 309 290,00 Kč za oběžná aktiva, která se skládají z částek za zásoby (109 290,00 Kč) a peněžní prostředky (200 000,00 Kč).

**Pasiva** jsou tvořena základním kapitálem a předpokládaným výsledkem hospodaření za účetní období (rok) **1 637 148,24 Kč**. (viz kapitola Rozpočet předpokládaných nákladů, výnosů). Podrobně rozepsaná rozvaha je k dispozici v elektronické příloze Ekonomická kalkulace/List Rozvaha.



### 15.3.3. Rozpočet předpokládaných nákladů a výnosů

#### 1) Spotřeba materiálu

Spotřeba materiálu pro genetickou analýzu slouží pro tři fáze procesu:

- a) Sběr vzorků
- b) Extrakce DNA
- c) Proces PCR

#### a) Sběr vzorků

Sběr vzorků je nutné provádět za použití odpovídajícího vybavení. Hlavní důraz je kladen na separování vzorků, tak aby nedošlo k pomíchání vzorků DNA jednotlivých jedinců a dále je nutná detailní evidence, tak aby nedošlo nejen k pomíchání jednotlivých jedinců, ale aby bylo možno i zpětné dohledání dle dokumentace.

Potřebný spotřební materiál je uveden v tabulce 29 včetně kalkulace nákladů na jeden vzorek.

Tabulka 29 Spotřební materiál potřebný pro sběr vzorků

Materiál na sběr	Počet (ks)/Množství (l)	Cena za kus	Cena celková
Uzavíratelný ZIP sáček	1	8,00 Kč	8,00 Kč
Štěpařský vosk	0,01	65,00 Kč	0,65 Kč
96% ethanol	0,004	530,00 Kč	2,12 Kč
<b>Cena materiálu na vzorek</b>			<b>10,77 Kč</b>

#### b) Extrakce DNA

Pro extrakci DNA je potřebné zakoupení odpovídajícího izolačního kitu, jehož různé varianty jsou dostupné u různých výrobců. Námí byl zvolen Plant Genomic DNA Mini Kit, jenž se řadí mezi časově méně náročné (celý proces izolace lze dokončit dle výrobce za 1 hodinu) a poskytuje potřebné koncentrace DNA na výstupu. V porovnání s dalšími kity určenými pro extrakci DNA rostlin také vychází jako nejvýhodnější varianta při přepočtu nákupní ceny na jeden vzorek.

Tabulka 30 Přehled purifikačních kitů určených k extrakci rostlinné DNA

	Jednotek v balení	Jed.	Cena balení	Cena/vzorek
<b>Plant Genomic DNA Mini Kit (GP100)</b>	100	ks	5 500,00 Kč	<b>55,00 Kč</b>
<i>GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit</i>	250	ks	14 450,00 Kč	<b>57,80 Kč</b>
DNeasy Plant Mini Kit (250)	250	ks	23 000,00 Kč	<b>92,00 Kč</b>
ChargeSwitch™ gDNA Plant Kit	96	ks	10 200,00 Kč	<b>106,25 Kč</b>

Pořizovací cena kitu se na trhu pohybuje okolo **5 500 Kč** bez daně a v rámci kitu obdržíte sadu bufferů, filtry a základní plastik (typické součásti většiny kitů).

Zbýlý spotřební materiál je kalkulován na jednu extrakci DNA a je vyčíslen v tabulce 31.

Tabulka 31 Spotřební materiál potřebný pro extrakci DNA

	Počet	Jed.	Cena za balení	Počet v balení	Jed.	Cena/ks, l	Cena/vzorek
<b>Rukavice</b>	1	ks	1 580,00 Kč	1000	ks	1,58 Kč	1,58 Kč
<b>Špičky</b>	11	ks	2 320,00 Kč	960	ks	2,42 Kč	26,58 Kč
<b>Zkumavky 1,5 ml</b>	2	ks	940,00 Kč	1000	ks	0,94 Kč	1,88 Kč
<b>Tekutý dusík</b>	0,1	l	50,00 Kč	48	l	1,04 Kč	0,10 Kč
<b>96 % ethanol</b>	0,003	l	530,00 Kč	1	l	530,00 Kč	1,59 Kč
<b>Skleněné kuličky</b>	2	ks	172,00 Kč	28300	ks	0,01 Kč	0,01 Kč
<b>Spotřeba materiálu pro extrakce DNA</b>			<b>5 592,00 Kč</b>			<b>Cena materiálu na vzorek</b>	<b>31,75 Kč</b>

Celkové náklady extrakce DNA na izolaci jednoho vzorku činí **86,75 Kč**. Jedná se o variabilní náklad, jenž se s objemem výroby lineárně mění.

### c) Proces PCR

Pro proces PCR je zapotřebí stejně jako proces izolace DNA koupě příslušného PCR kitu. V analýze byl kalkulován kit *Type-it Microsatellite PCR Kit (Mastermix)* firmy Qiagen, jenž se osvědčil jako spolehlivý a rychlý nástroj.

Tabulka 32 Spotřební materiál potřebný pro proces PCR

	Počet	Cena	Jed.	Cena/ks, na ml	Balení	Jed.	Cena balení
Rukavice	1	1,58 Kč	ks	1,58 Kč	1000	ks	1 580,00 Kč
folie na PCR	0,01	0,26 Kč	ks	24,90 Kč	100	ks	2 490,00 Kč
Špičky	4	2,73 Kč	ks	0,68 Kč	10000	ks	6 834,00 Kč
Forward primer	0,5	1,14 Kč	ml	2,28 Kč	1000	ml	2 275,00 Kč
Reverz primer	0,5	0,10 Kč	ml	0,20 Kč	1000	ml	200,00 Kč
Master Mix	10	18,54 Kč	ml	1,85 Kč	25000	ml	46 354,00 Kč
Destička	0,01	0,67 Kč	ks	64,75 Kč	80	ks	5 180,00 Kč
Strip	0,13	1,99 Kč	ks	15,92 Kč	125	ks	1 990,00 Kč
Zkumavka	1	1,19 Kč	ks	1,19 Kč	1000	ks	1 190,00 Kč
					<b>Celkové náklady na balení</b>		<b>68 093,00 Kč</b>

Samotná kalkulace celkových nákladů na vzorek v procesu PCR se následně odvíjí od metody provedení PCR. Používají se tři hlavní způsoby, a to PCR v destičce, ve stripu a ve zkumavce. Destička disponuje kapacitou pro zpracování až devadesáti šesti vzorků najednou, strip až osmi vzorků a zkumavka po jednom vzorku. Kalkulace nákladů na jeden vzorek byla vypočtena pro případ plně využití kapacity použitého nástroje.

Tabulka 33 Náklady na jeden vzorek dle technologie zpracování PCR

Varianta PCR reakce				Cena/vzorek
V destičce	1 992,76 Kč	96	vzorků	20,76 Kč
Ve stripu	164,54 Kč	8	vzorků	20,57 Kč
Ve zkumavce	25,28 Kč	1	vzorků	25,28 Kč

### Ostatní materiál – administrativní náklady

Ostatní spotřební materiál a administrativní úkony, nelze vyčíslit na jednotku, neboť nedochází k jejich fyzické spotřebě. Za tímto účelem jsou tyto položky kalkulovány pomocí hromadné ceny jako oběžný nepřímý majetek. V částce jsou zahrnuty například tyto položky: Popisový materiál, čepelky, sterilizační přípravek (líh), papírové ubrousky, pracovní podložky,

dokumentace, fixa, zahradnické nůžky, rukavice, sekyra, průbojník atd. Hromadná cena činí **19 Kč** na jeden zpracovaný vzorek.

Tabulka 34 Ostatní oběžný majetek na jeden vzorek

Předmět		Množství	Cena
Popisový materiál	Hromadná cena	1 vzorek	<b>19,00 Kč</b>
Skalpel			
Sterilizační přípravek (líh)			
Papírové ubrousky			
Pracovní podložky			
Dokumentace			
Fixa			
Zahradnické nůžky			
Rukavice			
Sekyra			
Průbojník			

## 2) Osobní náklady

Celkový proces byl zmapován v laboratořích katedry genetiky a fyziologie lesních dřevin ČZU a bylo provedeno opakovaný odhad časové náročnosti celého procesu na základě pozorování procesu. Na základě empirických pozorování byly dále určeny hranice produktivity práce, kterou je jeden laborant v rámci jedné pracovní směny schopen naplnit. V případě **pesimistické varianty** (nižší produktivita) bylo nastaveno kritérium na **24** plně zpracovaných **vzorků** od extrakce DNA po vyhodnocení vzorku na sekvenátoru a v případě **optimistické varianty** (vyšší produktivita) bylo kritérium stanoveno na **32 vzorků** zpracovaných za směnu. Na základě těchto kritérií byla stanovena roční výrobní kapacita pro jednoho pracovníka na **5000 zpracovaných vzorků za rok v pesimistické variantě** a na **7500 zpracovaných vzorků v optimistické variantě**.

### Přímé mzdy – laborant

Na základě této úvahy je kalkulace nákladů provedena ve dvou variantách: optimistické a pesimistické. Dále byla provedena kalkulace změny nákladů při různém počtu pracovníků, a to

pro jednoho, tři a pět pracovníků na pracovišti, čímž se mění roční výrobní kapacita zařízení a na základě toho byla zvolena nejlepší varianta.

Pro **pesimistickou variantu** jsou tyto hodnoty stanoveny takto: **1 laborant-5 000 vzorků za rok, 3 laboranti-15 000 vzorků za rok a pět laborantů-25 000 vzorků za rok.**

Pro **optimistickou variantu** jsou tyto hodnoty stanoveny takto: **1 laborant-7 500 vzorků za rok, 3 laboranti-22 500 vzorků za rok a pět laborantů-37 500 vzorků za rok.**

Pro lepší přehlednost jednotlivých výpočtů jsou v tabulkách a textu označovány hodnoty přiřazené pro **pesimistickou** variantu **žlutou barvou** a pro **optimistickou** variantu **zelenou barvou**.

**Celkové náklady jsou vypočteny pro nejlevnější variantu zpracování PCR pomocí stripů, jež mají kapacitu 8 vzorků, a tudíž reflektují kritérium 24 až 32 vzorků za směnu, tedy 2 až 3 stripy za směnu/den.**

Přímé mzdy zahrnují pracovníky vykonávající, sběr vzorků-pozice terénní pracovník, laboratorní úkony-pozice laboranta a vyhodnocení dat a zpracování posudků-pozice hodnotitel analýzy. Finanční ohodnocení pozice terénní pracovník dosahuje **měsíční super hrubé mzdy 22 739,80 Kč**, finanční ohodnocení pozice laborant dosahuje **měsíční super hrubé mzdy 22 739,80 Kč** a finanční ohodnocení pozice analyzátor vzorků dosahuje **měsíční super hrubé mzdy 27 630,80 Kč**. Přehled ročních nákladů a rozpis přímých mezd ve výrobě jako náklady na vzorek obsahuje tabulka 35.

Tabulka 35 Rozpis přímých mezd

<i>Sběr vzorků</i>	Měsíční super hrubá mzda	Roční	Pracovní hodiny/měsíc	Hodinová mzda	Vzorků / den	Náklady na vzorek
<b>Terénní pracovník</b>	22 739,80 Kč	272 877,60 Kč	160	142,12 Kč	25	<b>45,48 Kč</b>
<i>Laboratoř</i>	Měsíční super hrubá mzda	Roční	Pracovní hodiny/měsíc	Hodinová mzda	Vzorků / den	Náklady na vzorek
<b>Laborant</b>	22 739,80 Kč	272 877,60 Kč	160	142,12 Kč	24	<b>54,58 Kč</b>
<b>Laborant</b>	22 739,80 Kč	272 877,60 Kč	160	142,12 Kč	32	<b>36,38 Kč</b>
<i>Vyhodnocení analýzy</i>	Měsíční super hrubá mzda	Roční	Pracovní hodiny/měsíc	Hodinová mzda	Vzorků / měsíc	Náklady na vzorek
<b>Analyzátor vzorků</b>	27 630,80 Kč	331 569,60 Kč	331 569,60 Kč	172,69 Kč	500	<b>55,26 Kč</b>

Na základě produktivity práce byly určeny náklady přímé mzdy na vzorek, a to jak v pesimistické variantě (5 000 zpracovaných vzorků za rok) v hodnotě **155,32 Kč za vzorek**, tak v optimistické variantě (7 500 zpracovaných vzorků za rok) v hodnotě **137,12 Kč za vzorek**.

### Ostatní osobní náklady (roční)

Platové podmínky jsou odvozeny ze mzdového předpisu ČZU. Plat vedoucího pracovníka je dále navýšen příplatkem za vedení skupiny do 10 osob (1 600 Kč) jako reflexi 3 různých variant dle počtu zaměstnanců. Dále je počítáno s průměrným měsíčním pracovním fondem 160 pracovních hodin, přičemž zaměstnanec na pozici uklízečka, je veden jen na poloviční úvazek.

Tabulka 36 Rozpis osobních nákladů

Mzdy ostatních pracovníků	Měsíční super hrubá mzda	Pohyblivá složka	Roční mzda	Pracovní hodiny/měsíc	Hodinová mzda
Vedoucí laboratoře	44 662,20 Kč	1 600,00 Kč	535 946,40 Kč	160	279,14 Kč
Uklízečka	5 494,00 Kč	0,00 Kč	65 928,00 Kč	80	68,68 Kč
<b>Celkem</b>			<b>601 874,40 Kč</b>		

### 3) Odpisy

Byly zjištěny odpisy pro přístrojové vybavení, budovu laboratoře (tj. dlouhodobého hmotného majetku - DHM) a odpisy pro software GeneMarker (tj. dlouhodobého nehmotného majetku -DNM).

Účetní odpisy byly stanoveny na základě vnitřní SMĚRNICE KVESTORA ČZU Č. 13/2011 *Odepisování dlouhodobého hmotného a nehmotného majetku*. V rámci směrnice jsou vymezeny předměty odepisování DHM a DNM, daňové odpisy a účetní odpisy. V rámci účetních odpisů jsou pak stanoveny odpisové skupiny, účetní doba odepisování (v letech) a z nich odvozené účetní procento.

Předpokládaný majetek laboratoře spadá do odpisových skupin 1,2 a 5. Účetní odepisování u skupiny 1 tvoří odpisy po dobu 5 let s ročním účetním odpisovým procentem 20,00 %, u skupiny 2 odepisujeme po dobu 9 let s ročním účetním odpisovým procentem 11,11 % a u skupiny 5, odpisy po dobu 100 let s ročním účetním odpisovým procentem 1 %.

Tabulka 37 Odpisy majetku

<i>Dlouhodobý hmotný majetek</i>	Pořizovací cena	Odpisová skupina	Účetní odpisové procento	Roční odpisy
Oscilační mlýnek	234 500,00 Kč	2	11,11%	26 052,95 Kč
Termoshaker	51 500,00 Kč	2	11,11%	5 721,65 Kč
Termoblok	12 670,00 Kč	2	11,11%	1 407,64 Kč
Vortex	4 490,00 Kč	2	11,11%	498,84 Kč
Výrobek ledu	89 990,00 Kč	2	11,11%	9 997,89 Kč
Centrifuga	86 100,00 Kč	2	11,11%	9 565,71 Kč
Mikrocentrifuga	135 000,00 Kč	2	11,11%	14 998,50 Kč
Nano drop	245 400,00 Kč	2	11,11%	27 263,94 Kč
Sada nastavitelných pipet	66 400,00 Kč	2	11,11%	7 377,04 Kč
Multikanálová pipeta	23 200,00 Kč	2	11,11%	2 577,52 Kč
Stojan na pipety	6 500,00 Kč	2	11,11%	722,15 Kč
Opakovací dávkovač (repeater)	8 700,00 Kč	2	11,11%	966,57 Kč
Lednice	36 549,00 Kč	2	11,11%	4 060,59 Kč
Mrazák	82 755,00 Kč	2	11,11%	9 194,08 Kč
Autoklav	123 500,00 Kč	2	11,11%	13 720,85 Kč
Termocykler	197 500,00 Kč	2	11,11%	21 942,25 Kč
Sekvenátor	3 600 000,00 Kč	2	11,11%	399 960,00 Kč
Počítačová sestava	60 000,00 Kč	1	20,00%	12 000,00 Kč
Budova laboratoře	7 000 000,00 Kč	5	1,00%	70 000,00 Kč
<b>Celkem</b>	<b>12 064 754,00 Kč</b>			<b>638 028,17 Kč</b>
<i>Dlouhodobý nehmotný majetek Software (licence)</i>	Pořizovací cena	Odpisová skupina	Účetní odpisové procento	Roční odpisy
GeneMarker	72 000,00 Kč	1	20,00%	14 400,00 Kč
<b>Celkem</b>	72 000,00 Kč			<b>14 400,00 Kč</b>

Roční odpisy **dlouhodobý hmotný majetek (DHM)** činí **638 028,17 Kč za rok**.

Suma ročních odpisů pro **dlouhodobý nehmotný majetek (DNM)** činí **14 400,00 Kč za rok**.

**Celková suma ročních odpisů tak dosahuje 652 428,17 Kč.**

#### 4) Náklady na energie

Celkové náklady na energie bylo nutné kalkulovat kombinovaně, neboť některé nákladové položky bylo nutné z části odhadnout.

Náklady na elektrickou energii byly vykalkulovány na základě příkonu či spotřeby jednotlivých zařízení, která udával výrobce v technické dokumentaci jednotlivých přístrojů a časovému vytížení přístroje během analýzy, které bylo empiricky změřeno. K výpočtu cenové kalkulace

byla použita **průměrná cena elektrické energie 3,50 Kč/kWh**. Na základě těchto údajů byly odhadnuty roční náklady na elektrickou energii za laboratorní přístroje na **132 497,26 Kč**.

Spotřeby za vodné, stočné, osvětlení či vytápění pak byly kvalifikovaně odhadnuty na cca **50 000 Kč** za rok. Výsledné **roční náklady** na energie tak činí **182 497,26 Kč**. Tato částka byla zahrnuta v nákladech dle stejného principu jako odpisy, tedy dle roční výrobní kapacity pracoviště a dle počtu a směnné výkonosti laborantů.

### **5) Opravy a údržba**

Roční částka stanovená na opravy a údržbu strojů je odvozena na základě zkušeností z provozu genetického pracoviště na FLD ČZU. Částka pokrývá pravidelnou kontrolu, údržbu a kalibraci strojů a případné opravy při opotřebení majetku. Dále částka kryje náklady na každoroční aktualizace technologického a softwarového vybavení laboratoře (10 000 Kč) a náklady na dozorovou činnost akreditačního institutu a s tím spojenou agendou (30 000 Kč).

Celkové roční náklady na opravy a údržbu tak dosahují částky **130 000 Kč** za rok.

### **6) Náklady na pojištění**

Náklady na pojištění byly zjištěny pomocí fiktivní poptávky u několika zdrojů. Přesnější odhad ročních nákladů na pojištění pro podnikatelský subjekt byl získán u společnosti Česká podnikatelská pojišťovna a.s. finanční skupiny Vienna Insurance Group. V rámci pojištění je zahrnuto živelném pojištění budovy laboratoře a majetku laboratoře, a to v celkové pojistné hodnotě 12 milionů Kč. Dále se započítalo pojištění proti odcizení, a také pojištění strojů a elektroniky proti náhodným událostem.

Celková částka pojištění byla vykalkulována na **52 258 Kč** za rok.



Tabulka 38 Rozpis jednotlivých položek pojištění

Sjednaná pojistná nebezpečí	Pojistné
Živelné pojištění	13 308 Kč
Pojištění proti odcizení	26 700 Kč
Pojištění strojů a elektroniky	64 509 Kč
Celková sleva	50 %
<b>Celkové pojistné po slevě</b>	<b>52 258 Kč</b>
Frekvence plateb	Roční

## 7) Akreditace

Samotné udělení či neudělení akreditace pro dané pracoviště není pro chod samotné laboratoře nikterak zavazující. Laboratoř není omezena v činnosti, pokud není držitelem akreditace pro dané pracovní výkony, avšak určitá forma prokázání odbornosti pracoviště může být žádoucí.

V České Republice je proces udělení a kontroly akreditace výhradně v rukou **Českého institutu pro akreditaci, o.p.s.**, jenž zastává pozici národního akreditačního orgán. Veškeré informace o procesu akreditace a potřebná dokumentace je dostupná na stránkách institutu: <http://www.cia.cz>.

Tento orgán poskytuje podporu, školení, proces akreditace i kontroly dle potřebných norem a zároveň zajišťuje akreditační registraci na mezinárodní úrovni. Celý proces akreditace pro genetické, potažmo zkušební laboratoře probíhá dle norem: ČSN EN ISO/IEC 17011 Požadavky na akreditační orgány akreditující orgány posuzování shody a ČSN EN ISO/IEC 17025 Všeobecné požadavky na kompetenci zkušebních a kalibračních laboratoří. Samotná akreditace je udělována na dobu pěti let a dodržování kritérií je pravidelně dozorováno ČIA.

Proces akreditace se skládá z následujících kroků:

- a) přezkoumání žádosti o akreditaci nebo návrhu a uzavření VPS nebo jejího dodatku,
- b) posuzování, tj. příprava na posuzování včetně přezkoumání předložené dokumentace, záznamů, posuzování na místě,
- c) posouzení způsobu odstranění zjištěných neshod,
- d) rozhodování,
- e) následné prověřování plnění akreditačních požadavků (pravidelné a mimořádné dozory).

Propočet nákladů na proces akreditace je proveden dle SDĚLENÍ Českého institutu pro akreditaci, o.p.s. o vyhlášení Kalkulace nákladů řízení/akreditačního procesu ČIA. Toto sdělení udává jednotlivé fáze akreditace, předpokládanou spotřebu času na proces akreditace a hodinovou sazbu, kterou si institut účtuje za poskytované služby. Od 1.1.2010 je tato hodinová sazba stanovena ve výši **1 130,00 Kč**.

Tabulka 39 Kalkulace nákladů na akreditaci

<b>Kalkulace nákladů na akreditaci</b>		<b>Hodinová sazba</b>
Hodinová sazba		1 130,00 Kč
<b>Proces posouzení se skládá z následujících kroků:</b>	<b>Počet hodin</b>	<b>Cena</b>
a) přezkoumání žádosti o vydání osvědčení o akreditaci	5	5 650,00 Kč
b) posuzování	82	92 660,00 Kč
c) posouzení způsobu odstranění zjištěných neshod	X	
d) rozhodování o akreditaci	5	5 650,00 Kč
e) dozory	18	20 340,00 Kč
f) cestovní výdaje	X	
	Suma	124 300,00 Kč
Administrativní poplatky spojené s úkony akreditace		27 000,00 Kč
Registrace pro mezinárodní měřítko		3 500,00 Kč
<b>Celkové náklady na akreditaci</b>	<b>Celková suma</b>	<b>154 800,00 Kč</b>

Celkové náklady na realizaci akreditace se dle orientační kalkulace pohybují okolo **154 800,00 Kč**. Tato částka odpovídá veřejně prezentovaným nákladům, které uvádějí organizace disponující udělenou akreditací u ČIA. ČIA a další instituce dále uvádějí, že každoroční náklady na dozorovou a administrativní činnost a aktualizace akreditace dosahují částky přibližně **30 000 Kč**.

Samotný proces akreditace je značně časově i finančně nákladný. Jsou zde velké administrativní nároky a samotné období získání akreditace se může pohybovat i v řádech několika let. Dále jsou tu vysoká kritéria na rozdělení pracovního prostoru, separovanou evidenci procesů a vzorků či oddělené vykonávání laboratorních činností, což často přináší další finanční náklady. Značnou faktickou překážkou je nutnost akreditovat každý protokol samostatně. Tj. v případě ověřování deklarovaného původu reprodukčního materiálu postup pro každou dřevinu.

## 8) Účetnictví

Účetnictví pro danou firmu bylo na základě úvahy kalkulováno jako služba u externí firmy. Držení vlastních pracovních sil k dané problematice by bylo více jak dvojnásobně vyšší a tudíž nerentabilní.

Poptávkou po službě u specializovaných zařízení bylo zjištěno, že nákladová položka pro firmu s naším předpokládaným objemem účtovaných položek a předpokládaným ročním obratem do 20 mil., se pohybuje okolo 10 500 Kč za měsíc, tedy 126 000 Kč ročně.

## 9) Cestovné

V rámci sběru vzorků je nutné zahrnutí položky cestovného. Pro naši kalkulaci bylo využito předpisu ČZU pro hrazení cestovních náhrad, který udává cenové náhrady při cestě vlastním vozidlem pro služební účely 4 Kč náhrady za každý ujetý kilometr, plus 2 Kč na každý ujetý kilometr jako náhradu za pohonné hmoty. Celková částka cestovní náhrady tak činí 6 Kč na kilometr. Pro naši kalkulaci byla zvolena průměrná vzdálenost lokality sběru 150 km, tedy průměrně 300 km za jeden výjezd. Podrobná kalkulace je v tabulce 40.

Tabulka 40 Cestovní náhrady

1 výjezd pro sběr vzorků	Prům. cestovní vzdálenost z bodu A do bodu B (km)	Prům. cestovní náhrady za užití vlastního vozu ke služební cestě (Kč/km)	Prům. cestovní náhrady za pohonné hmoty (Kč/km)	Průměrné celkové náklady na jeden výjezd	Prům. počet sebraných vzorků za výjezd (ks)	Náklady na jeden vzorek
Náklady	150	4,00 Kč	2,00 Kč	1 800,00 Kč	25	72,00 Kč

## Předpokládaná výše ročních výnosů

Předpokládaná výše výnosů vychází nejen z množství provedených analýz vzorků za rok, ale také z ceny.

## Cena a zisk

Cena je konkurenčně orientovaná. Díky kalkulaci známe vyčíslené náklady, které tvoří hlavní složku naší ceny. Zisková přírážka byla určena na základě mapování trhu a fiktivních poptávek u konkurence. Získaná data ukázala, že rozdíl mezi náklady námi produkováného počtu vzorků a nejnižší konkurencí účtované ceny tvoří přibližně 35 %. Pro kalkulaci ceny byla stanovena zisková přírážka na jeden vzorek 30 % z ceny nákladů na vzorek. Tato cena umožňuje zohlednit případné nečekané navýšení nákladů výroby či snížení cen konkurence, která by mohla nastat při dlouhodobé spolupráci.

## Výkaz zisku a ztráty

Simulační výkaz zisku a ztráty za první roční období byl zpracován pro námi zvolenou variantu tří pracovníků s nižší roční produktivitou. Simulované **tržby** za roční období byly odhadnuty v 10 068 041,83 Kč, provozní výsledek hospodaření dosáhnul 2 399 909,02 Kč, **výsledek hospodaření za účetní období** pak dosáhnul **1 637 148,24 Kč** a čistý obrat za účetní období činí 10 068 041,83 Kč. Podrobně rozepsaný výkaz zisku a ztráty je součástí elektronické přílohy Ekonomická kalkulace/List V1 a V2.

#### 15.3.4. Kalkulace nákladů na 1 vzorek

V rámci předběžné kalkulace byla stanovena kalkulační jednice = 1 vzorek. Kalkulace nákladů byla provedena ve dvou variantách dle výkonosti 1 laboranta, a to pesimistická varianta a optimistická varianta a zároveň byl vzat v úvahu objem výroby. Analýza je kalkulována ve třech různých verzích dle počtu laborantů, potažmo na základě předpokládané celkové roční výrobní kapacity pracoviště a dále ve dvou variantách dle produkce pracovníků, a to **pesimistické variantě (24 vzorků/směna)** a **optimistické variantě (32 vzorků/směna)**.

Varianta pesimistická předpokládá, že výkonnost jednoho laboranta je 24 plně zpracovaných a analyzovaných vzorků za směnu, potažmo maximální roční výrobní kapacita podniku s jedním laborantem dosahuje 5 000 zpracovaných vzorků za rok. Tato hranice byla zvolena záměrně nižší, než je maximální dosažitelný počet zpracovaných vzorků za rok při plném využití ročního pracovního fondu, aby reflektovala možné problémy spojené s prolukami v dodávání zkoumaného materiálu či nezdařenými genetickými analýzami.

Varianta optimistická předpokládá, že výkonnost jednoho laboranta je 32 plně zpracovaných a analyzovaných vzorků za směnu, potažmo maximální roční výrobní kapacita podniku s jedním laborantem dosahuje 7 500 zpracovaných vzorků za rok. Tato hranice představuje předpokládanou maximální výrobní kapacitu za rok v případě plynulé výroby, bez výrazného výskytu rušivých elementů.

Počty pracovníků v sekci sběr vzorků a analýzy vzorků jsou odvislé od výrobní kapacity laboratoře.

#### Kalkulační vzorec:

***Úplné vlastní náklady výkonu na 1 vzorek =***

***Přímý materiál + přímé mzdy + výrobní režie + správní režie***

##### 1) Přímý materiál

Skládá se z nákladů na materiál na sběr vzorků, materiálu potřebného k izolaci DNA, izolačního kitu a materiálů na proces PCR. Ten je možný vyhotovovat třemi různými způsoby. Pro každý tento způsob je provedena kalkulace

Tabulka 41 Přímý materiál na jeden vzorek dle použité technologie PCR

Typ zpracování PCR	PCR/destička	PCR/strip	PCR/zkumavka
Materiál na sběr vzorků	10,77 Kč	10,77 Kč	10,77 Kč
PCR	20,76 Kč	20,57 Kč	25,28 Kč
DNA kit (Genomic DNA Mini Kit)	55,00 Kč	55,00 Kč	55,00 Kč
Extrakce DNA	31,75 Kč	31,75 Kč	31,75 Kč
<b>Součet cena/ 1 vzorek</b>	<b>118,28 Kč</b>	<b>118,09 Kč</b>	<b>122,80 Kč</b>

Přímé materiál na zpracování 1 vzorku vychází pro destičku v hodnotě 118,28 Kč, pro metodu strip 118,09 Kč a pro metodu zkumavka 122,80 Kč.

## 2) Přímé mzdy

Jedná se o mzdy terénního pracovníka, laboranta a analyzátoru výsledků, které je možné kalkulovat na jeden vzorek.

Tabulka 42 Příjímé mzdy

Pracovní pozice	Vzorků/den	Náklady na vzorek
Terénní pracovník (9. mzdová třída)	25	45,48 Kč
Laborant – Pesimistická varianta produkce (24)	24	54,58 Kč
Laborant – Optimistická varianta produkce (32)	32	36,38 Kč
Analyzátor vzorků (11. mzdová třída)	500	55,26 Kč

Náklady na jednoho pracovníka, který zpracovává jeden vzorek, činí **155,32 Kč** při pesimistické variantě respektive **137,12 Kč** při optimistické variantě.

## 3) Výrobní režie

Výrobní režii tvoří základní složky tak, jak jsou popsány v rešeršní části. Dominantní položka výrobní režie byla tvořena odpisy dlouhodobého hmotného majetku (DHM) a dlouhodobého nehmotného majetku (DNM). Dále zde byly započítány další položky: oběžný spotřební majetek, spotřeba energie, opravy a údržba a cestovné.

Roční částka odpisů dlouhodobého hmotného a nehmotného majetku byla propočítána ve výši 652 428 Kč (viz kapitola Odpisy).

**Kalkulace odpisů pro pesimistickou variantu kalkulace nákladů činí 130,49 Kč na vzorek.**

Tabulka 43 Kalkulace odpisů na 1 vzorek – pesimistická varianta

	Roční výrobní kapacita vzorků		
	5000 ks	15 000 ks	25 000 ks
Odpisy DHM	127,61 Kč	42,54 Kč	25,52 Kč
Odpisy DNH	2,88 Kč	0,96 Kč	0,58 Kč
<b>Odpisy celkem</b>	<b>130,49 Kč</b>	<b>43,50 Kč</b>	<b>26,10 Kč</b>

Kalkulace odpisů pro **optimistickou** variantu kalkulační nákladů činí **86,99 Kč na vzorek**.

Tabulka 44 Kalkulace odpisů na 1 vzorek – optimistická varianta

	Roční výrobní kapacita vzorků		
	7500 ks	22500ks	37500 ks
Odpisy DHM	85,07 Kč	28,36 Kč	17,01 Kč
Odpisy DNH	1,92 Kč	0,64 Kč	0,38 Kč
<b>Odpisy celkem</b>	<b>86,99 Kč</b>	<b>29,00 Kč</b>	<b>17,40 Kč</b>

### Kalkulace nákladů na energie

Roční náklady na energie byly staveny v předpokládané výši 182 497 Kč.

Tabulka 45 Kalkulace energie na 1 vzorek

	Roční výrobní kapacita vzorků					
	Pesimistická varianta			Optimistická varianta		
	5000	15000	25000	7500	22500	37500
<b>Náklady/vzorek</b>	<b>36,50 Kč</b>	<b>12,17 Kč</b>	<b>7,30 Kč</b>	<b>24,33 Kč</b>	<b>8,11 Kč</b>	<b>4,87 Kč</b>

### Kalkulace nákladů na opravy a udržování

Celkové **roční náklady** byly stanoveny na **130 000 Kč**. Rozpočet nákladů je proveden obdobně, jako u nákladů na energie v pesimistické a optimistické variantě dle produktivity práce a počtu pracovníků.

Tabulka 46 Kalkulace opravy a udržování na 1 vzorek

	Roční výrobní kapacita vzorků					
	Pesimistická varianta			Optimistická varianta		
	5000	15000	25000	7500	22500	37500
<b>Náklady/vzorek</b>	<b>26,00 Kč</b>	<b>8,67 Kč</b>	<b>5,20 Kč</b>	<b>17,33 Kč</b>	<b>5,78 Kč</b>	<b>3,47 Kč</b>

## Oběžný nepřímý majetek

V této položce je zahrnuta celá škála halířových nákladových položek, k jejichž spotřebě dochází během zpracovávání analýzy a jejich praktické vyčíslení je takřka nemožné a položek nespádajících mezi odpisové. Kvalifikovaným odhadem tak byla stanovena nákladová položka na **19 Kč na jednu extrakci**. Částka zahrnuje například náklady na popisový materiál, skalpely, ochranné pomůcky, papíry, podložky, stojany, drobné náčiní, dokumentaci, drobný spotřební materiál atd.

## Cestovné

Dle předpisu ČZU o vyplácení náhrad činí celková částka za 1 ujetý kilometr 6 Kč. Průměrná ураžená vzdálenost na lokalitu a zpět na pracoviště je stanovena na 300 km.

Tabulka 47 Kalkulace nákladů tvořených cestovními náhradami na jeden sebraný vzorek

1 výjezd pro sběr vzorků	Průměrná ураžená vzdálenost	Prům. cestovní náhrady za užití vlastního vozu ke služební cestě (Kč/km)	Celkové náklady na jeden výjezd	Prům. počet sebraných vzorků za výjezd (ks)	Náklady na jeden vzorek
Náklady	300	6,00 Kč	1 800,00 Kč	25	<b>72,00 Kč</b>

## Výrobní režie celkem

Na základě dílčích položek zahrnutých do výrobní režie byla stanovena celková hodnota výrobní režie, a to zvlášť pro pesimistickou variantu (tabulka 48) a pro optimistickou variantu (tabulka 49).

Tabulka 48 Výrobní režie celkem – pesimistická varianta

	Roční výrobní kapacita vzorků		
	5000	15000	25000
Spotřeba energie/jedna extrakce	36,50 Kč	12,17 Kč	7,30 Kč
Opravy a údržba	26,00 Kč	8,67 Kč	5,20 Kč
Oběžný nepřímý majetek/jedna extrakce	19,00 Kč	19,00 Kč	19,00 Kč
Odpisy dlouhodobý hmotný majetek	127,61 Kč	42,54 Kč	25,52 Kč
Odpisy dlouhodobý nehmotný majetek	2,88 Kč	0,96 Kč	0,58 Kč
Cestovné	72,00 Kč	72,00 Kč	72,00 Kč
<b>Součet</b>	<b>283,99 Kč</b>	<b>155,33 Kč</b>	<b>129,60 Kč</b>



Náklady na výrobní režii na zpracování jednoho vzorku v laboratoři jedním zaměstnancem činí **283,99 Kč**.

Tabulka 49 Výrobní režie celkem – optimistická varianta

	Roční výrobní kapacita vzorků		
	7500	22500	37500
Spotřeba energie/jedna extrakce	24,33 Kč	8,11 Kč	4,87 Kč
Opravy a údržba	17,33 Kč	5,78 Kč	3,47 Kč
Oběžný nepřímý majetek/jedna extrakce	19,00 Kč	19,00 Kč	19,00 Kč
Odpisy dlouhodobý hmotný majetek	85,07 Kč	28,36 Kč	17,01 Kč
Odpisy dlouhodobý nehmotný majetek	1,92 Kč	0,64 Kč	0,38 Kč
Cestovné	72,00 Kč	72,00 Kč	72,00 Kč
<b>Součet</b>	<b>219,66 Kč</b>	<b>133,89 Kč</b>	<b>116,73 Kč</b>

Náklady na výrobní režii na zpracování jednoho vzorku v laboratoři jedním zaměstnancem činí **219,66 Kč**.

#### 4) Správní režie

Správní režie zahrnuje nepřímé mzdy za pracovníky (jedná se o vedoucího laboratoře a uklízečku), pojištění majetku, náklady na akreditaci laboratoře, účetnictví a zároveň jsou zde zahrnuty náklady spojené s úvěrem. Všechny uvedené náklady byly znovu rozpočteny dle maximální roční výrobní kapacity (tabulka 50 – 54).

Mzda je následně rozpočtena dle směnné výkonnosti na optimistickou a pesimistickou variantu.

Pro **pesimistickou** variantu byla určena nákladová položka na jednoho laboranta na jeden vzorek **83,04 Kč** a **optimistická** varianta **55,36 Kč** na jeden vzorek. Náklad na vzorek se lineárně snižuje s rostoucím počtem laborantů.

Tabulka 50 Kalkulace nepřímých nákladů – mzdy ostatních pracovníků

Mzdy ostatních pracovníků	Roční mzda v Kč	Mzda ostatních pracovníků na 1 ks	
		Roční výrobní kapacita	
		Pesimistická varianta 5000 ks	Optimistická varianta 7500 ks
Vedoucí laboratoře	535 946,40 Kč	107,19 Kč	71,46 Kč
Uklízečka	65 928,00	13,19 Kč	8,79 Kč
<b>celkem</b>	<b>601 874,40 Kč</b>	<b>120,37 Kč</b>	<b>80,25 Kč</b>

### Kalkulace nákladů na pojištění majetku

Roční náklady na pojištění jsou následně rozpočteny dle výrobní kapacity podniku v závislosti na počtu zaměstnanců a směnné výkonosti v pesimistické variantě (10,45 Kč na vzorek na jednoho pracovníka) a optimistické variantě (6,97 Kč na vzorek na jednoho pracovníka).

Tabulka 51 Kalkulace pojištění majetku na 1 vzorek

	Roční výrobní kapacita vzorků					
	Pesimistická varianta			Optimistická varianta		
	5000	15000	25000	7500	22500	37500
<b>Náklady/vzorek</b>	<b>10,45 Kč</b>	<b>3,48 Kč</b>	<b>2,09 Kč</b>	<b>6,97 Kč</b>	<b>2,32 Kč</b>	<b>1,39 Kč</b>

### Kalkulace nákladů na akreditaci

Roční náklady na získání akreditace laboratoře byly zjištěny ve výši 154 800 Kč (viz kapitola Akreditace).

Tabulka 52 Kalkulace nákladů na akreditaci na 1 vzorek

	Roční výrobní kapacita vzorků					
	Pesimistická varianta			Optimistická varianta		
	5000	15000	25000	7500	22500	37500
<b>Náklady/vzorek</b>	<b>30,96 Kč</b>	<b>10,32 Kč</b>	<b>6,19 Kč</b>	<b>20,64 Kč</b>	<b>6,88 Kč</b>	<b>4,13 Kč</b>

Náklady na akreditaci dosahují v pesimistické variantě 30,96 Kč na vzorek na jednoho pracovníka a optimistické variantě 20,64 Kč na vzorek na jednoho pracovníka.

## Kalkulace nákladů na účetnictví

Roční náklady na účetnictví byly zjištěny ve výši 126 000 Kč (viz kapitola Účetnictví).

Tabulka 53 Kalkulace nákladů na účetnictví na 1 vzorek

	Roční výrobní kapacita vzorků					
	Pesimistická varianta			Optimistická varianta		
	5000	15000	25000	7500	22500	37500
Externí firma	25,20 Kč	8,40 Kč	5,04 Kč	16,80 Kč	5,60 Kč	3,36 Kč

Náklady na účetnictví dosahují v pesimistické variantě 25,20 Kč na vzorek na jednoho pracovníka a optimistické variantě 16,80 Kč na vzorek na jednoho pracovníka.

## Kalkulace nákladů na úvěr

Vstupní investice bude plně hrazena podnikatelským úvěrem. Roční úrokové byl stanoven na hodnotě 3,07 % úvěru, a to na základě průměrných úrokových hodnot uvedených ve zprávě ČNB pro období říjen 2018 pro nefinanční podniky s obratem 7,5 až 30 mil. Kč. Roční náklady na úvěr byly tudíž započteny ve výši 378 788,39 Kč (viz kapitola Financování majetku).

Tabulka 54 Kalkulace nákladů na úvěr na 1 vzorek

	Roční výrobní kapacita vzorků					
	Pesimistická varianta			Optimistická varianta		
	5000	15000	25000	7500	22500	37500
Náklady	75,72 Kč	25,25 Kč	15,15 Kč	50,50 Kč	16,83 Kč	10,10 Kč

Náklady na úvěr dosahují v pesimistické variantě 75,75 Kč na vzorek na jednoho pracovníka a optimistické variantě 50,50 Kč na vzorek na jednoho pracovníka.

## Správní režie celkem

Tabulka 55 a 56 ilustruje rozvržené náklady správní režie pro pesimistickou variantu, respektive pro optimistickou variantu.

Tabulka 55 Správní režie celkem – pesimistická varianta

	Roční výrobní kapacita vzorků		
	5000	15000	25000
Vedoucí laboratoře/ředitel	107,19 Kč	35,73 Kč	21,44 Kč
Uklízečka	13,19 Kč	4,40 Kč	2,64 Kč
Pojištění majetku	10,45 Kč	3,48 Kč	2,09 Kč
Akreditace	30,96 Kč	10,32 Kč	6,19 Kč
Účetnictví	25,20 Kč	8,40 Kč	5,04 Kč
Nákladové úroky (úvěr)	75,75 Kč	25,25 Kč	15,15 Kč
<b>Součet</b>	<b>262,73 Kč</b>	<b>87,58 Kč</b>	<b>52,55 Kč</b>

Náklady na správní režii na zpracování jednoho vzorku v laboratoři jedním zaměstnancem činí **262,73 Kč**.

Tabulka 56 Správní režie celkem – optimistická varianta

	Roční výrobní kapacita vzorků		
	7500	22500	37500
Vedoucí laboratoře/ředitel	71,46 Kč	23,82 Kč	14,29 Kč
Uklízečka	8,79 Kč	2,93 Kč	1,76 Kč
Pojištění majetku	6,97 Kč	2,32 Kč	1,39 Kč
Akreditace	20,64 Kč	6,88 Kč	4,13 Kč
Účetnictví	16,80 Kč	5,60 Kč	3,36 Kč
Nákladové úroky (úvěr)	50,50 Kč	16,83 Kč	10,10 Kč
<b>Součet</b>	<b>175,16 Kč</b>	<b>58,39 Kč</b>	<b>35,03 Kč</b>

Náklady na správní režii na zpracování jednoho vzorku v laboratoři jedním zaměstnancem činí **175,16 Kč**.

## Úplné vlastní náklady výkonu na jeden vzorek dle varianty provedení PCR – pesimistická varianta

Kalkulace nákladů na jeden vzorek je provedena v devíti různých variantách, a to dle počtu zaměstnanců, potažmo využití maximální roční výrobní kapacity podniku a dle způsobu provedení PCR. Maximální roční kapacita výroby podniku byla určena lineárně na základě počtu zaměstnanců a produktivity jednoho zaměstnance.

Tabulka 57 Kalkulace celkových nákladů na jeden vzorek– pesimistická varianta

	Roční výrobní kapacita vzorků		
	5000	15000	25000
<b>Celkové náklady na 1 vzorek-destička</b>	820,31 Kč	516,50 Kč	455,74 Kč
<b>Celkové náklady na 1 vzorek-strip</b>	820,12 Kč	516,31 Kč	455,55 Kč
<b>Celkové náklady na 1 vzorek-zkumavka</b>	824,84 Kč	521,03 Kč	460,26 Kč

## Celkové roční náklady při využití maximální výrobní kapacity podniku dle varianty provedení PCR

Na základě úplných vlastních nákladů na jeden vzorek jsou stanoveny předpokládané celkové roční náklady při maximálním využití výrobní kapacity podniku.

Tabulka 58 Kalkulace celkových ročních nákladů při plném využití pracoviště – pesimistická varianta

Maximální roční výrobní kapacita	5000	15000	25000
<b>Celkové roční náklad-destička</b>	4 101 567,49 Kč	7 747 510,12 Kč	11 393 452,75 Kč
<b>Celkové roční náklad-strip</b>	4 100 613,30 Kč	7 744 647,56 Kč	11 388 681,81 Kč
<b>Celkové roční náklad-zkumavka</b>	4 124 191,55 Kč	7 815 382,31 Kč	11 506 573,06 Kč

Podrobná kalkulační jednotlivých nákladových položek je podrobně rozepsána v příloze elektronické příloze Laboratoř-kalkulace.

## Úplné vlastní náklady výkonu na jeden vzorek dle varianty provedení PCR – optimistická varianta

Kalkulace nákladů na jeden vzorek je provedena v devíti různých variantách, a to dle počtu zaměstnanců, potažmo využití maximální roční výrobní kapacity podniku a dle způsobu

provedení PCR. Maximální roční kapacita výroby podniku byla určena lineárně na základě počtu zaměstnanců a produktivity jednoho zaměstnance.

Tabulka 59 Kalkulace celkových nákladů na jeden vzorek – optimistická varianta

Max. roční výrobní kapacita	7500	22500	37500
Celkové náklady na 1 vzorek-destička	650,22 Kč	447,67 Kč	407,16 Kč
Celkové náklady na 1 vzorek-strip	650,02 Kč	447,48 Kč	406,97 Kč
Celkové náklady na 1 vzorek-zkumavka	654,74 Kč	452,20 Kč	411,69 Kč

### Celkové roční náklady při využití maximální výrobní kapacity podniku dle varianty provedení PCR

Na základě úplných vlastních nákladů na jeden vzorek jsou stanoveny předpokládané celkové roční náklady při maximálním využití výrobní kapacity.

Tabulka 60 Kalkulace celkových ročních nákladů při plném využití pracoviště – optimistická varianta

Max. roční výrobní kapacita	7500	22500	37500
Celkové roční náklad-destička	4 876 614,35 Kč	10 072 650,69 Kč	15 268 687,04 Kč
Celkové roční náklad-strip	4 875 183,07 Kč	10 068 356,85 Kč	15 261 530,63 Kč
Celkové roční náklad-zkumavka	4 910 550,44 Kč	10 174 458,98 Kč	15 438 367,51 Kč

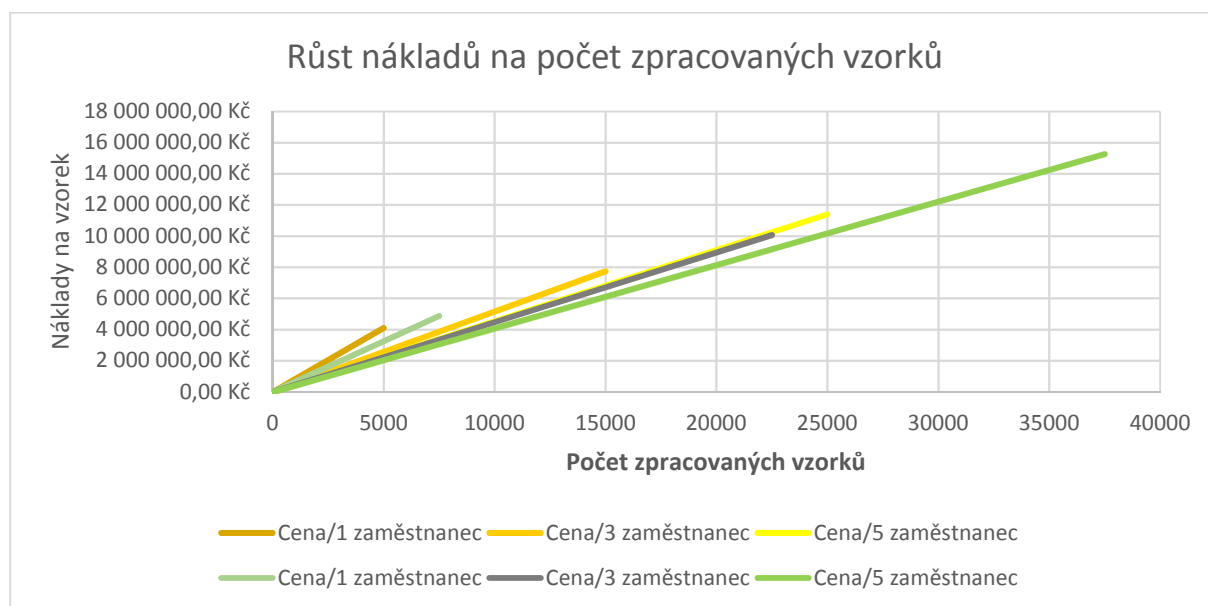
Podrobná kalkulační jednotlivých nákladových položek je podrobně rozepsána v elektronické příloze Laboratoř-kalkulace.

### Porovnání nákladů s výkonností pracovníků, roční produktivitou a volba metodiky

Na základě nákladové kalkulační se ukázalo, že **cenově nejvhodnější metoda** pro další kalkulační je metodika využívající pro PCR metodu **strip**.

Pro danou metodiku je sestaven hypotetický graf 4 ukazující, v jaké závislosti se mění cena a objem zpracovaných vzorků ve vztahu k počtu pracovníků v laboratoři. Pro **pesimistickou variantu** jsou křivky vybarveny v **odstínech žluté** a pro **optimistickou variantu** v **odstínech zelené**.

Graf 4 Růst nákladů dle počtu laborantů a produktivity práce



U obou variant je vidět výrazné snížení úhlu křivky v růstu nákladů na produkci u laboratoře s jedním laborantem a se třemi laboranty. Větší rozdíl už však není pozorovatelný u počtu tří a pěti laborantů. Na základě toho lze odvodit, že nárůst počtu laborantů nad hladinu tří má za efekt zrychlení zpracování vzorků a zvýšení maximální roční výrobní kapacity zařízení, ale zároveň s sebou nepřináší žádné významné snížení nákladů na rozbor jednoho vzorku a zvyšuje nároky na využití daného pracoviště. Na základě tohoto vyhodnocení byl zvolen pro další kalkulaci **počáteční optimální počet pracovníků laboratoře na hodnotě 3 laborantů**.

Předpokládané nákladové hranice na vzorek určené pesimistickou a optimistickou kalkulací jsou tudíž **516,31 Kč** (pesimistická varianta) až **447,48 Kč** (optimistická varianta). Výsledné náklady na vzorek by se měly pohybovat mezi těmito hranicemi dle celkové roční produktivity práce.

### 15.3.5. Bod zvratu a kritické využití výrobní kapacity

Pomocí analýzy bodu zvratu je možné stanovit množství, při kterém dojde k vyrovnání tržeb a nákladů, tudíž nevzniká zisk ani ztráta. Bod zvratu umožňuje stanovit spodní hranici nezbytného počtu analyzovaných vzorků za rok, aby realizace podnikatelského záměru nebyla ztrátová.

Vzorec:

$$\text{Bod zvratu } (Q) = \frac{\text{Fixní náklady}}{\text{cena} - \text{variabilní náklady na jeden vzorek}}$$

Pro vyhodnocení bodu zvratu byla stanovena **míra zisku 30 %** tedy 130 % vynaložených nákladů. Vyhotovení bylo provedeno ve dvou variantách produktivity, a to optimistické a pesimistické.

Kritické využití výrobní kapacity vyjadřuje v procentech minimální dlouhodobé roční kapacitní využití provozu. Pokud by poptávky po testování vzorků v provozu kleslo pod danou míru, bude provoz daného podniku ztrátový, a tudíž dlouhodobě neudržitelným.

Bod zvratu byl stanoven dle vzorce:

$$q(BEP) = \frac{FC}{p - b}$$

Kritické využití výrobní kapacity bylo stanoveno dle vzorce:

$$q_{pkrit} = \frac{q(BEP) \cdot 100}{q_p}$$

Kalkulace byla provedena pro metodu strip ve třech variantách dle počtu laborantů a zároveň v pesimistické a optimistické variantě.

Pro námi zvolenou variantu tří laborantů jsou určeny hranice pro **bod zvratu mezi 11346 až 15008** zpracovanými vzorky ročně a kritické využití výrobní kapacity laboratoře se pohybuje mezi **75,64 % a 66,70 %**.



Tabulka 61 Bod zvratu a kritické využití výrobní kapacity – Pesimistická varianta produkce

Bod zvratu dle počtu laborantů (ročního objemu výroby)	Počet laborantů	Počet jednotek, kdy se náklady rovnají výnosům	Kritické využití výrobní kapacity
Bod zvratu (24 směna/2 pracovník)	1	3808,70	76,17 %
Bod zvratu (24 směna/3 pracovník)	3	11345,85	75,64 %
Bod zvratu (24 směna/5 pracovník)	5	18856,26	75,43 %

Tabulka 62 Bod zvratu a kritické využití výrobní kapacity – Optimistická varianta produkce

Bod zvratu dle počtu laborantů (ročního objemu výroby)	Počet laborantů	Počet jednotek, kdy se náklady rovnají výnosům	Kritické využití výrobní kapacity
Bod zvratu (32 směna/2 pracovník)	1	5280,21	70,40 %
Bod zvratu (32 směna/3 pracovník)	3	15007,48	66,70 %
Bod zvratu (32 směna/5 pracovník)	5	24521,23	65,39 %

### 15.3.6. Výpočet výnosnosti podnikatelského záměru

Poměrové ukazatele výkonnosti podniku byly počítány pro míru zisku 30 % a životnost záměru byla kalkulována na období 9 let, tak aby kopírovala předpokládanou dobu odpisů většiny majetku.

### Ukazatele rentability

V rámci analýzy byly zjišťovány základní ukazatele rentability ROA, ROE, ROS, ROCE, dle metodiky uvedené v teoretické části práce. Veškeré výpočty byly realizovány pro ziskovou přírážku 30 % a pro roční objem výroby tří laborantů s nižší výkonností (pesimistická varianta) za účelem reflektování nižšího objemu prací.

Tabulka 63 Ukazatele rentability

	Zisk na 1 Kč zvolené základny	Ukazatel v %
ROA	0,14 Kč	14,46 %
ROE	0,12 Kč	11,72 %
ROS	0,20 Kč	20,08 %
ROCE	0,13 Kč	13,49 %

Ukazatel ROA vyjadřuje, jak velký zisk připadá na jednu korunu celkového majetku podniku. V našem případě je ukazatel necelých 14,5 %, což je z ekonomického hlediska uspokojivá hodnota výnosnosti majetku v porovnání k jiným možnostem investic na trhu.

Ukazatel ROE vyjadřuje míru zhodnocení vlastního kapitálu. Hodnotu je možné považovat za více než uspokojivou, protože kdybychom investovali vložený kapitál např. do banky, byly by míra zhodnocení (dosažená úroková míra) jistě nižší. V našem případě dosahuje cca 0,12 Kč zisku z 1 Kč vlastního kapitálu.

Ukazatel ROS vyjadřuje potenciální výnos, jenž je podnik schopen generovat z jedné koruny tržby. Jeho hladina dosahuje více jak 20 %, což znamená velmi uspokojivé ziskové rozpětí. Pro lepší interpretaci výsledků je nutné dlouhodobě sledovat tento ukazatel a zaznamenávat změny v jeho hodnotách.

Ukazatel ROCE udává výkonnost podniku v poměru k dlouhodobému majetku. Hodnota 13,49 % představuje uspokojivou hladinu do budoucna.

### **Metody hodnocení efektivnosti investic**

Pro analýzu návratnosti vložené investice do pořízení a vybavení laboratoře byly zvoleny metody hodnocení efektivnosti investice, a to:

- Metoda výnosnosti investice (ROI)
- Metoda doby splacené investice (PP – Payback Method)
- Metoda čisté současné hodnoty (NPV – Net Present Value)
- Metoda vnitřního výnosového procenta (IRR – Internal Rate of Return)

### **Metoda výnosnosti investice (ROI)**

Výnosnost investice vyjadřuje poměr průměrného ročního zisku ke kapitálovým výdajům na pořízení investice. Výnosnost investice je cca **12 %** (viz tabulka 64), což ukazuje na uspokojivé výnosové procento. Na základě této hodnoty je možné konfrontovat další varianty investice a případně se rozhodnout pro realizaci jedné z variant.

Tabulka 64 Metoda výnosnosti investice

Ukazatel	Hodnota v Kč
Průměrný roční zisk z investice	<b>1 734 214,91 Kč</b>
Kapitálový výdaj	<b>12 336 754,00 Kč</b>
ROI	<b>0,1241</b>

### Metoda doby splacené investice (Payback Method)

Tato metoda udává, za jak dlouhé období dojde ke kumulaci čistého příjmu z investice, který pokryje investiční výdaje (kapitálový výdaj). V rámci kalkulace se předpokládá čistý zisk v prvním a šestém roce v hodnotě 1 637 148,24 Kč a ve zbylých letech v hodnotě 1 761 948,24 Kč. Tento rozdíl je rozdílnou výší nákladů spojených se získáním akreditace laboratoře. Platnost akreditace je pět let, takže v šestém roce bude zisk snížen o náklady na její obnovení. Očekávaný peněžní příjem je dán součtem čistého zisku a odpisů (odpisy představuje částku 652 428,17 Kč ročně).

Tabulka 65 Výpočet předpokládané doby návratnosti

Rok	Očekávaný peněžní příjem	
	roční	kumulovaný
0	-12 336 754,00 Kč	<b>-12 336 754,00 Kč</b>
1	2 289 576,41 Kč	<b>-10 047 177,59 Kč</b>
2	2 414 376,41 Kč	<b>-7 632 801,18 Kč</b>
3	2 414 376,41 Kč	<b>-5 218 424,77 Kč</b>
4	2 414 376,41 Kč	<b>-2 804 048,36 Kč</b>
5	2 414 376,41 Kč	<b>-389 671,95 Kč</b>
6	2 289 576,41 Kč	<b>1 899 904,46 Kč</b>
7	2 414 376,41 Kč	<b>4 314 280,87 Kč</b>
8	2 414 376,41 Kč	<b>6 728 657,28 Kč</b>
9	2 414 376,41 Kč	<b>9 143 033,69 Kč</b>
	Doba návratnosti (počet let)	<b>5,21</b>

$$PP = 5 + \frac{389\,671,95}{2\,289\,576,41} = 5,21 \text{ roku}$$

Doba návratnosti dosáhla přibližně **hodnoty 5,2 roku**. Předpokládaná životnost laboratoře je 9 let. Hodnota doby návratnosti investice tak ukazuje, že na základě této metody je realizace záměru realizovatelná. Doba návratnosti investice je kratší než doba životnosti. Doba návratnosti investice však dosahuje poměrně vysoké hodnoty. Jedná se tedy o projekt s dlouhodobějším záměrem. Změna hodnoty závisí na schopnosti generace zisku společnosti v jednotlivých letech a její zlepšení se může projevit s vyšší produktivitou práce a dostatkem pracovních příležitostí.

### Metoda čisté současné hodnoty

Představuje rozdíl mezi současnou hodnotou očekávaných příjmů z investice a kapitálových výdajů na investice. Tato metoda bere v úvahu faktor času, tj. znehodnocování peněz. Při výpočtu je nutné zohlednit diskontní sazbu (udává zjednodušeně cenu peněz na trhu). Diskontní míra byla stanovena na základě průměrné sazby komerčního úvěru udávaném Českou národní bankou pro rok 2018 pro úvěry v cenové hladině (7,5 – 30 mil. Kč). Sazba dosahuje hodnoty 2,84 %. Následný výpočet umožňuje stanovit peněžní příjem podniku na konci jeho životnosti (9 let).

Tabulka 66 Výpočet čisté současné hodnoty

Rok	Peněžní příjem v Kč	Roční diskontovaný peněžní příjem v Kč	Kumulovaný diskontní peněžní příjem v Kč
0	-12 336 754,00 Kč	-12 336 754,00 Kč	-12 336 754,00 Kč
1	2 289 576,41 Kč	2 226 348,12 Kč	-10 110 405,88 Kč
2	2 414 376,41 Kč	2 282 868,23 Kč	-7 827 537,65 Kč
3	2 414 376,41 Kč	2 219 825,19 Kč	-5 607 712,46 Kč
4	2 414 376,41 Kč	2 158 523,13 Kč	-3 449 189,33 Kč
5	2 414 376,41 Kč	2 098 913,98 Kč	-1 350 275,35 Kč
6	2 289 576,41 Kč	1 935 453,47 Kč	585 178,11 Kč
7	2 414 376,41 Kč	1 984 588,65 Kč	2 569 766,76 Kč
8	2 414 376,41 Kč	1 929 782,82 Kč	4 499 549,58 Kč
9	2 414 376,41 Kč	1 876 490,49 Kč	<b>6 376 040,07 Kč</b>

Jelikož je výsledná hodnota NPV kladná, investice je výhodná. Investice do pořízení laboratoře se za dobu životnosti (9 let) plně uhradí a po devíti letech bude realizován příjem ve výši 6 376 040,07 Kč.

### Vnitřní výnosové procento

Pracuje na obdobném principu jako NPV s rozdílem, že zde hledáme diskontní míru, pro kterou se očekávané příjmy z investice budou rovnat hodnotě výdajů na investici.

Tabulka 67 Výpočet vnitřního výnosového procenta

Rok	Diskontované čisté cash flow (čistý peněžní tok)			
	při diskontní míře (i) 12,00 %		při diskontní míře (i) 13,00 %	
	roční	kumulovaný	roční	kumulovaný
0	-12 336 754,00 Kč	-12 336 754,00 Kč	-12 336 754,00 Kč	-12 336 754,00 Kč
1	2 044 264,65 Kč	-10 292 489,35 Kč	2 026 173,81 Kč	-10 310 580,19 Kč
2	1 924 726,09 Kč	-8 367 763,26 Kč	1 890 810,88 Kč	-8 419 769,31 Kč
3	1 718 505,44 Kč	-6 649 257,82 Kč	1 673 283,96 Kč	-6 746 485,34 Kč
4	1 534 379,86 Kč	-5 114 877,96 Kč	1 480 782,27 Kč	-5 265 703,08 Kč
5	1 369 982,02 Kč	-3 744 895,94 Kč	1 310 426,79 Kč	-3 955 276,29 Kč
6	1 159 970,66 Kč	-2 584 925,28 Kč	1 099 725,97 Kč	-2 855 550,32 Kč
7	1 092 141,27 Kč	-1 492 784,01 Kč	1 026 256,39 Kč	-1 829 293,93 Kč
8	975 126,14 Kč	-517 657,87 Kč	908 191,50 Kč	-921 102,43 Kč
9	870 648,34 Kč	352 990,47 Kč	803 709,29 Kč	-117 393,14 Kč
<b>IRR-vnitřní výnosové procento</b>			<b>12,75 %</b>	

$$IRR = i_n + \frac{NPV_n}{NPV_n + |NPV_v|} \cdot (i_v - i_n) = 12 + \frac{352\,990,47}{352\,990,47 + 117\,393,14} \cdot (13 - 12) = 12,75\%$$

Pro výpočet vnitřního výnosového procenta byla použita lineární extrapolace, při které bylo zjištěno, že vnitřní výnosové procento ve výši 12,75 %. Uvažovaná diskontní míra při výpočtu čisté současné hodnoty investice, se kterou lze uvedené IRR srovnat, je na úrovni průměrné sazby komerčního úvěru zveřejněné Českou národní bankou. Vnitřní výnosové procento je vyšší než tato sazba (2,84 %), a proto je pořízení genetické laboratoře výhodné.

Všechny uvedené metody použité pro hodnocení efektivnosti investice vychází příznivě. Z tohoto důvodu je možné realizaci investice doporučit.

#### 15.4. Shrnutí ekonomické analýzy

V rámci nákladové kalkulace byla vyhodnocena hranice rentability pro zřízení samostatného subjektu k aplikaci metodiky s roční kapacitou minimálně 15 000 vzorků, a to pracoviště se třemi laboratorními pracovníky provádějícími analýzu DNA. Tato úvaha je založena na nezbytnosti dosažení kritického využití výrobní kapacity interního pracoviště na takové úrovni, aby korelovalo s množstvím testovaných vzorků, od kterého je účelné zřízení interní laboratoře namísto zadávání analýzy u externího dodavatele.

V uvedeném případě maximální roční výrobní kapacity pracoviště 15 000 vzorků, je hodnota bodu zvratu pro pracoviště 11 346 zpracovaných vzorků ročně. Zároveň minimální hodnota zpracovaných zakázek v daném roce, od kterého je účelné interní zpracování analýzy namísto zadání zakázky externě, je 10 118 zpracovaných vzorků (viz. Graf 5 průsečík přímky 3 zaměstnanci a CD Genomics). V případě takovéto realizace pak zároveň získáváme uspokojivou hodnotu rezervy výrobní kapacity. Rezerva dosahuje hodnoty 3 654 vzorků, tedy přibližně jedné čtvrtiny maximální roční výrobní kapacity.

Realizace záměru při nižší maximální roční výrobní kapacitě pracoviště vykazuje hodnoty příliš nízké či záporné a v takovém případě je efektivnější realizace genetické analýzy pomocí zakázky u externího pracoviště (viz graf 5).

Zjištěná doba návratnosti činí přibližně 5,2 roku. Projekt je koncipován na předpokládanou dobu životnosti 9 let, tudíž doby návratnosti dosáhneme přibližně ve dvou třetinách doby životnosti projektu. Z pohledu analýzy je tedy možné projekt realizovat s dlouhodobějším záměrem, ovšem z ekonomického hlediska je nutné brát v potaz úvahu, jak stabilní je dané odvětví a zda není možné, že v době návratnosti (5,2 roku) nedojde k výrazným změnám v technologii, v nákladových položkách či k jiným změnám, které by mohly značně ovlivnit předpokládanou hodnotu. V takovém případě je účelná realizace pomocí dodavatelského konceptu, která i přes možné vyšší jednotkové náklady na realizaci dosahuje vysoké pružnosti, co se týče množství realizovaných zakázek a zároveň přenáší riziko spojené s vývojem odvětví na dodavatele.

## Porovnání jednotlivých poptávek

Před rozhodováním, zda investici do pořízení genetické laboratoře realizovat, je nutné srovnat náklady na proces izolace DNA a generování dat u interní laboratoře, s dalšími variantami u externích dodavatelů (tabulka 25). Pro vlastní pracoviště se třemi laboranty tak můžeme také kalkulovat vzorovou poptávku pro genotypizaci 500 vzorků. Náklady na realizaci takovéto analýzy dosahují v daném případě za dílčí služby **332,80 Kč** (za proces izolace DNA a generování dat). Daná částka je vypočtena z úplného vlastního nákladu na jeden vzorek **516,31 Kč** (při použití metody strip a maximální roční výrobní kapacitě pracoviště 15 000 vzorků (tabulka 57) a je oproštěna o náklady spojené se sběrem a vyhodnocováním dat.

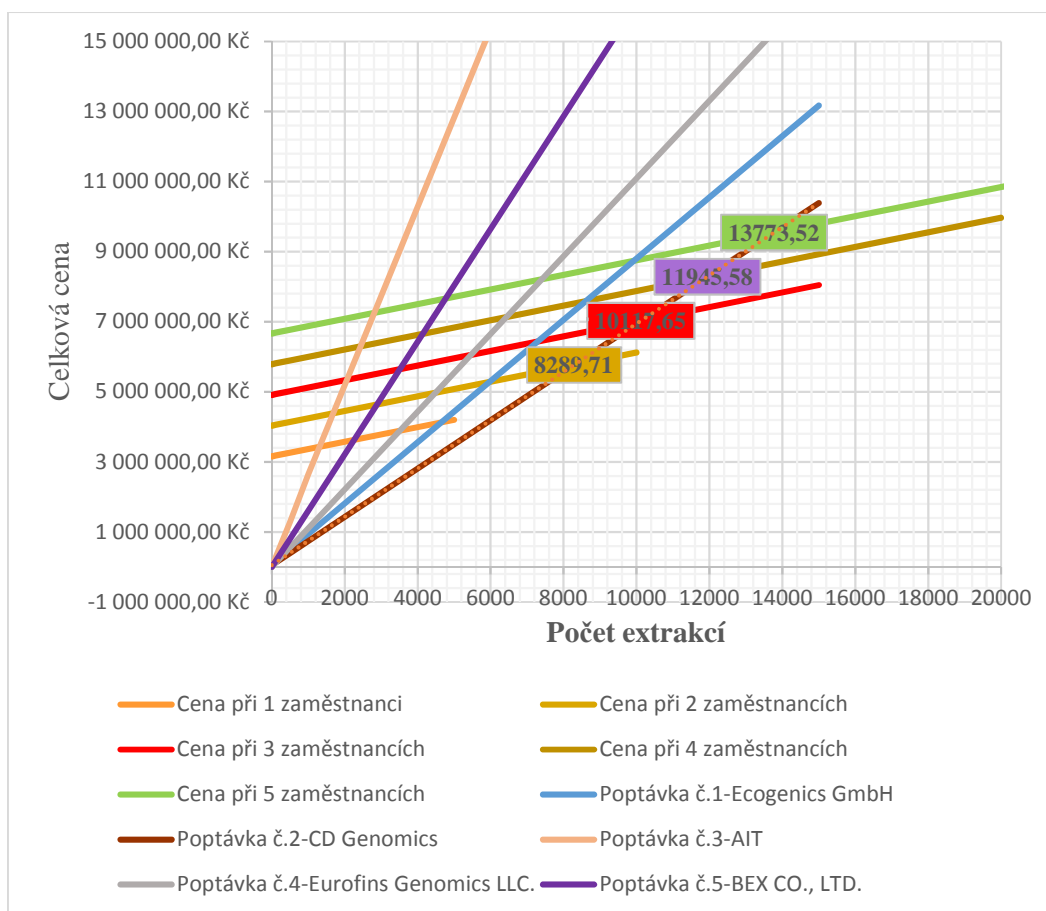
**Celkový náklad na analýzu 500 vzorků tak činí 166 399,32 Kč, doba realizace je přibližně 5 týdnů.**

Podle údajů z tabulky 25 bude genetická analýza hypotetické poptávky 500 vzorků externí laboratoří nejlevněji a za nejkratší dobu provedena ve společnosti **CD Genomics**. Při porovnání nabídky CD Genomics s náklady, které vzniknou při realizaci „vlastním“ pracovištěm, pak vidíme, že cenový rozdíl se pohybuje okolo 40 procent, což se může jevit jako dostatečný odstup. Avšak tento rozdíl je způsoben především tím, že kalkulace interní laboratoře zahrnuje minimální míru zisku a je nutné proto brát v potaz, zda daný rozdíl dosahuje uspokojivé hodnoty, při které se vyplatí riziko spojené s realizací investice. Zásadním faktorem je také otázka mzdových nákladů – zda je v tržním prostředí reálné získat kvalitní zaměstnance jejich ohodnocením podle mzdového předpisu použitého v analýze. Vzhled k současné situaci na trhu práce bude pravděpodobnější scénář smluvní mzdy s vyššími mzdovými náklady.

Pro snadnou orientaci byl sestaven graf 5 porovnávající hypotetický vývoj nákladů na realizaci u externích společností s realizací pomocí interního pracoviště. Do grafu byly zaneseny fixní náklady a náklady na jeden vzorek metodou strip, získané při tvorbě podnikatelského záměru. Dále byly zaneseny do grafu poptávky konkurenčních subjektů s předpokladem lineárního vývoje nákladů rozšířené o náklady spojené se sběrem a analýzou dat zahrnující materiál, mzdy a další položky (variabilní náklad: **228,24 Kč/vzorek**, stejný pro všechny). Výsledný graf umožňuje analyzovat, jakým způsobem se skokově mění fixní náklady a maximální možný objem realizovaných analýz dle výrobní kapacity pracoviště a zároveň vyjadřuje počet vzorků,

u kterého dochází k vyrovnání nákladů na realizaci analýzy interní metodou a zakázkou u externího dodavatele.

Graf 5 Náklady u externích firm a interní náklady dle počtu analyzovaných vzorků



Z grafu 5 je zřejmé, že náklady na realizaci záměru pouze s jedním laborantem převyšují možnost zadávání zakázky u nejlevnější konkurenční společnosti (CD Genomics). Obdobně je na tom realizace záměru se dvěma laboranty, která sice překročí hranici výhodnosti projektu (8 290 vzorků), ale je zde velmi krátká perioda jeho rentability (10 000-8 290= **1 710 vzorků**), tudíž riziko nenaplnění minimální hodnoty výrobní kapacity je velmi vysoké.

Na základě úvahy je tak možné konstatovat, že minimální počet pracovníků by měl začínat na 3 laborantech, aby realizace v rámci interní laboratoře byla výhodná a riziko únosné. Zároveň je zřejmé, že minimální hladina roční produktivity laboratoře by měla být cca 15 000 zpracovaných vzorků za rok (uvažovaná pesimistická varianta). Interní laboratoř bude výhodná od minimálního počtu **10118 zpracovaných vzorků za rok** (průsečík 3 zaměstnanci a CD Genomics), rezerva činí: 15 000-10 118 = **4 882 vzorků**. Pokud nebude v plánu dosáhnout této



minimální hladiny testovaných vzorků, je nákladově vhodnější pracovní úkony realizovat u externího dodavatele.

Při vyšším počtu zpracovaných vzorků ročně než uvažovaná hladina 15 000 vzorků, pak bude nutné vyžadovat navýšení maximální roční výrobní kapacity laboratoře, což povede ke skokovému nárůstu fixních nákladů spojených se zaměstnáním většího počtu laborantů.

Pracoviště se třemi laboranty může dosahovat maximální roční výrobní kapacity mezi **15 000 a 22 500** zpracovanými vzorky a to odvisle od produktivity laborantů.

Maximální náklad na jeden **kompletně zpracovaný vzorek** (proces tzv. na klíč) u interního pracoviště při naplnění kapacity výroby alespoň 15 000 vzorky za rok pak dosahuje **516,31 Kč**. Se **zvýšující se produktivitou práce** dochází k rozpuštění části fixních nákladů a k poklesu ceny za zpracovanou jednotku **až k hladině 447,48 Kč**.

V případě porovnávání výhodnosti realizace s nabídkou externích pracoviště je nutné kalkulovat s dílčí nákladovou položkou, neboť proces sběru a vyhodnocení dat neposkytují externí firmy, ale zřizuje je vždy zadavatel zakázky a tudíž tyto náklady vznikají pouze jemu.

Náklady na dílčí část procesu pro optimální variantu třech laborantů, které můžeme porovnávat s externími dodavateli tak činí **332,80 Kč**.

Náklady na samotný proces sběru a vyhodnocení dat se v tomto optimálním případě pohybují okolo **228,24 Kč** za zpracovaný vzorek. Se změnou zpracovaného množství dochází k výrazné fluktuaci ceny, neboť zde vznikají externí náklady na vybavení, či nepřímé mzdy.

Pro tuto optimální variantu byly vypočteny ukazatele rentability a bylo provedeno hodnocení efektivnosti investice, které nám poskytuje podklad pro objektivní zhodnocení záměru a zároveň podklad pro kontrolu vývoje a realizace v budoucnu. Hodnoty hlavních ukazatelů (doba návratnosti 5,2 roku a vnitřní výnosové procento 12,75 %) vycházejí uspokojivě a však jedná se o projekt s dlouhodobějším charakterem.

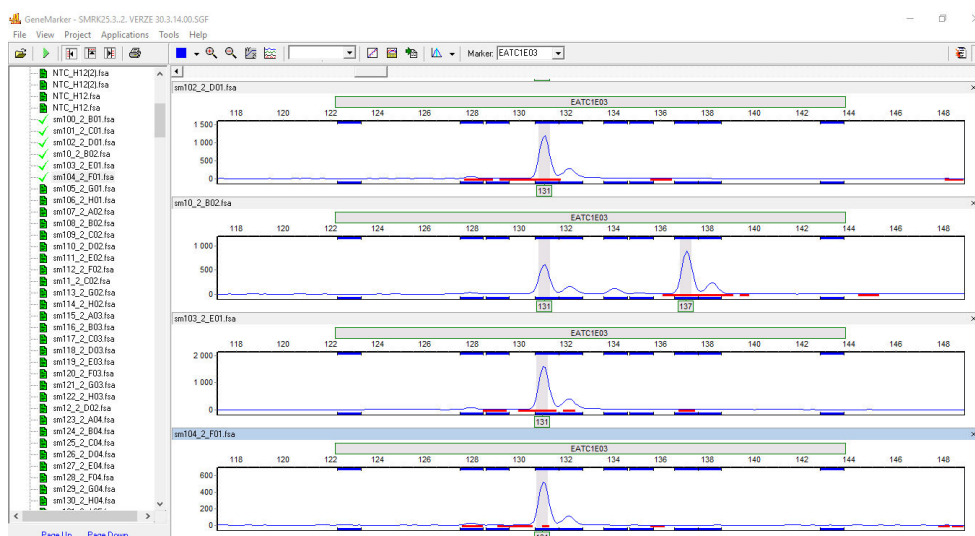
Závěr založený na hodnocení efektivnosti investice ukazuje, že realizace pracoviště je odvislá od objemu pracovních příležitostí a určuje jako minimální objem ročních prací 15 000 vzorků a více. Od této hladiny je možné podnikatelský záměr realizovat.

## 16. Přílohy

### 16.1. Obecné zásady

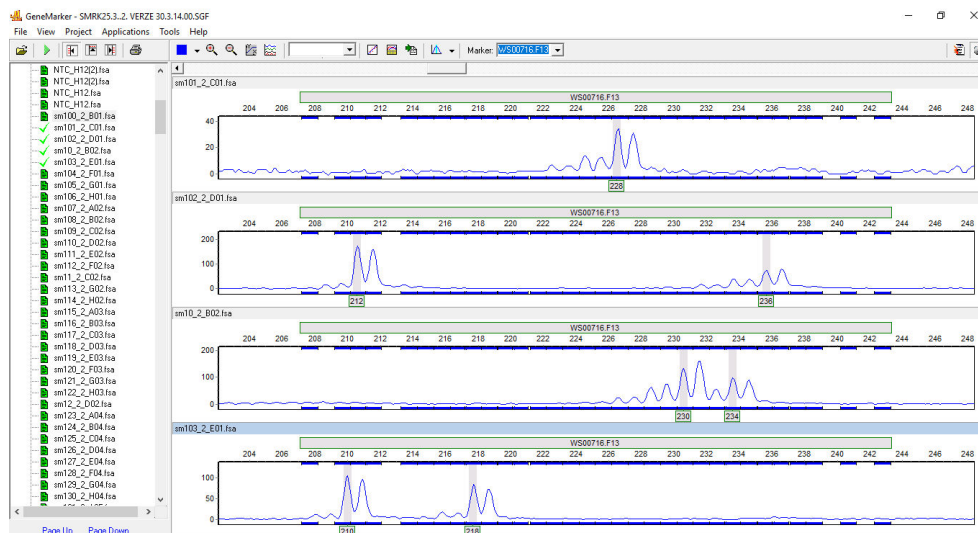
#### 16.1.1. Příklady vyhodnocení výstupů fragmentační analýzy

Na obrázku 38 je vyobrazena situace vyhodnocení dat pomocí softwaru GeneMarker. Jedná se o čtyři pod sebou vyobrazené vzorky. Je zde patrné, že každý vzorek vytvořil minimálně jeden peak, tedy vrchol. V případě prvního, předposledního a posledního vzorku se jedná o homozygotního jedince, identické alely diploidního jedince jsou v překryvu. V případě dvou vrcholů relativně stejné intenzity (výšky) v předpokládaném délkovém rozsahu pro příslušný lokus se jedná o heterozygota, jako v případě druhého vzorku.

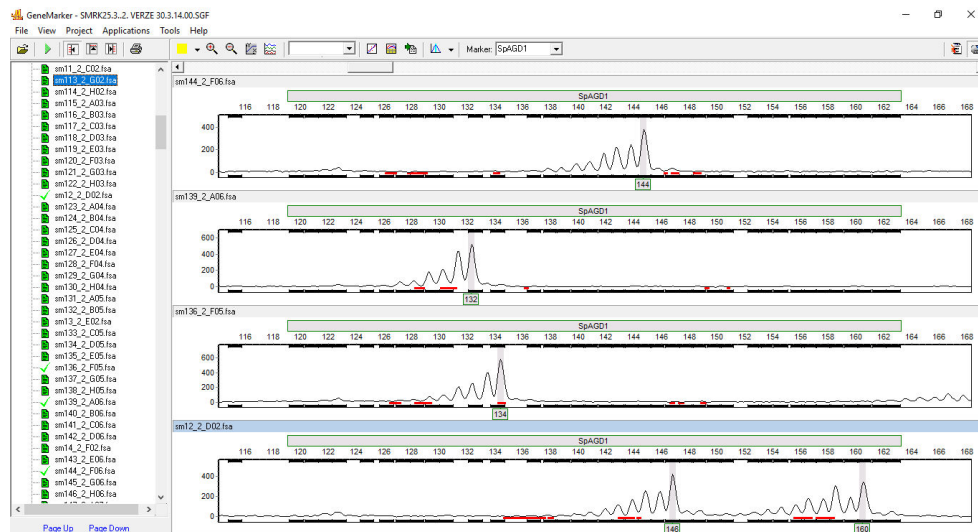


Obrázek 38 Vyobrazení výstupů ze softwaru GeneMarker, ideální tvar ampliconu

Často ovšem může docházet k situaci, kdy se zobrazí u jedné alely více vrcholů, jedná se o nepravé alely. Buďto dvojrcholy (obr. 39) nebo hřebínky (obr. 40). V takových případech je zapotřebí postupovat systematicky a detekovat alely s ohledem na předpokládaný charakter peaku, který se odvíjí především od obecně známých artefaktů enzymu polymerázy.



Obrázek 39 Vyhodnocení dat, tvoření dvojrcholů



Obrázek 40 Vyhodnocení dat, tvorba hřebínků

## 16.2. Buk lesní

Tabulka 68 Číselné vymezení vzorků buku lesního v rámci geografických lokalit

BK	PLO	LS	lokalita (číslo GZ)
1-10	21	Frýdlant	84-1 Jizerskohorské bučiny
11-20	3	Kladská	058-2 Holina
21-30	1	Litvínov	94 Červený Hrádek - Telč
31-40	13	Boubín	016-1 Zátoň - Kubova Huť
41-50	14	Nové Hrady	046-1 Novohradské hory
51-60	10	Hluboká	21-1 Hluboká
61-70	27	Jeseník	164/1 Jeseník
71-80	40	Frýdek – Místek	260 Kobylanka
81-90	38	Luhačovice	156-Vlára
91-100	31	Lanškroun	256-1 Bukové rezervace

Tabulka 69 Geografické souřadnice zájmových jedinců buku lesního

LS	ID	Zeměpisná šířka	Zeměpisná délka		LS	ID	Zeměpisná šířka	Zeměpisná délka
Frýdlant	Bk1	50,8767200354486	15,0964510068297		Hluboká	Bk51	49,10687523	14,4972181
	Bk2	50,8768340293318	15,0959139782935			Bk52	49,10721671	14,49685693
	Bk3	50,8858480118215	15,1042719930410			Bk53	49,10738527	14,49725021
	Bk4	50,8852799702435	15,1040249783545			Bk54	49,10673542	14,49765254
	Bk5	50,8853320218622	15,1042149960994			Bk55	49,10601843	14,49821446
	Bk6	50,8790900185704	15,1250189635902			Bk56	49,10436619	14,49578103
	Bk7	50,8733700402081	15,1100140158087			Bk57	49,10410551	14,49615939
	Bk8	50,8738169632852	15,1090469956398			Bk58	49,10438128	14,49669868
	Bk9	50,8736960124224	15,1082020159810			Bk59	49,10412622	14,49693966
	Bk10	50,8742850087583	15,1077120099216			Bk60	49,10406863	14,49763888
Kladská	Bk11	50,0034239608794	12,6503310352563		Jeseník	Bk61	50,19348403	17,23236697
	Bk12	50,0035309977829	12,6497380156069			Bk62	50,19326099	17,23166599
	Bk13	50,0034959614276	12,6493729837238			Bk63	50,19295899	17,23193396
	Bk14	50,0032870005816	12,6487399823963			Bk64	50,19279202	17,23194804
	Bk15	50,0030060391873	12,6492930203676			Bk65	50,19263604	17,23128696
	Bk16	50,0045720301568	12,6487300079315			Bk66	50,19224402	17,23125896
	Bk17	50,0041710399091	12,6499800011515			Bk67	50,19437796	17,22931503
	Bk18	50,0043820124119	12,6495650131255			Bk68	50,19393498	17,22884296
	Bk20	50,0048659835010	12,6484170276671			Bk69	50,19365201	17,22862797
						Bk70	50,19342897	17,22845304
Litvínov	Bk21	50,6144809629768	13,3891040179878		Frýdek- Místek	Bk71	49,52783796	18,47552097
	Bk22	50,6142259854823	13,3884410094469			Bk72	49,52797903	18,47505201
	Bk23	50,6136560160666	13,3877560403198			Bk73	49,52851798	18,47509702
	Bk24	50,6129930075258	13,3873510267585			Bk74	49,52909298	18,47459704
	Bk25	50,6126299872994	13,3874060120433			Bk75	49,52902199	18,47387703
	Bk26	50,6125760078430	13,3871750067919			Bk76	49,52968198	18,474288
	Bk27	50,6125510297715	13,3874699659645			Bk77	49,53042101	18,474232
	Bk28	50,6122940406203	13,3865489624440					

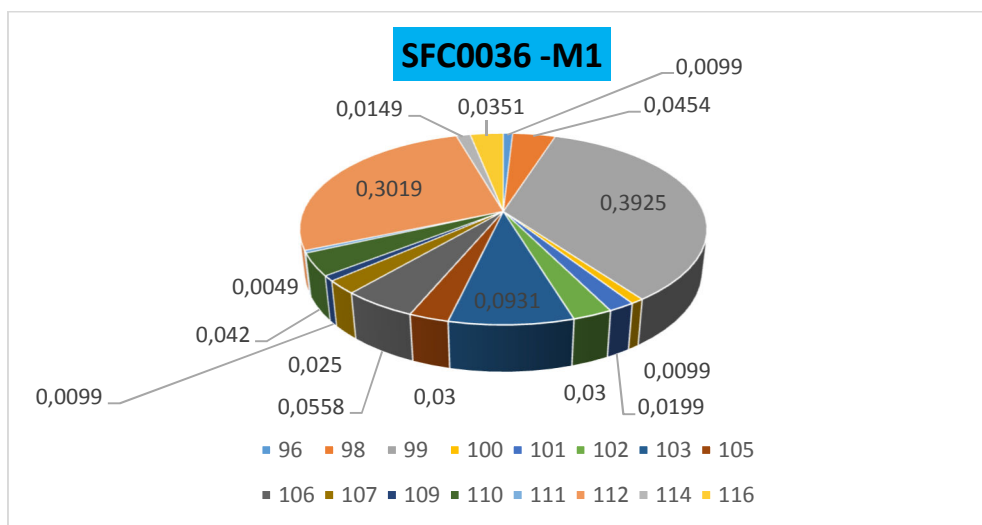
	Bk29	50,6120099779218	13,3859660010784			Bk78	49,531011101	18,47485897
	Bk30	50,6115959957242	13,3874289784580			Bk79	49,53166497	18,474274
						Bk80	49,530447	18,47535904
Boubín	Bk31	49,1509730089455	13,6642610281705					
	Bk32	49,1509720031172	13,6655130330473			Bk81	49,05202397	18,07156504
	Bk33	49,1511920280754	13,6668170057237			Bk82	49,05248498	18,07173201
	Bk34	49,1514100413769	13,6673650145530			Bk83	49,05283199	18,07208598
	Bk35	49,1515289805829	13,6675479914993			Bk84	49,05297599	18,07234003
	Bk36	48,9556969609111	13,8359219860285			Bk85	49,05303298	18,07218203
	Bk37	48,9557680394500	13,8370240386575		Luhačovice	Bk86	49,05165902	18,07193401
	Bk38	48,9562639966607	13,8380809966474			Bk87	49,05144897	18,07167803
	Bk39	48,9563039783388	13,8391689676791			Bk88	49,05130204	18,07150796
	Bk40	48,9563769847154	13,8398800045251			Bk89	49,05111898	18,07216904
						Bk90	49,05082804	18,07215898
Nové Hrady	Bk41	48,6615055706351	14,6815536729991					
	Bk42	48,6613862961530	14,6807270497083			Bk91	49,93583699	16,50880697
	Bk43	48,6619291920214	14,6800829004496			Bk92	49,93577404	16,50893798
	Bk44	48,6627783626317	14,6799072995781			Bk93	49,93560498	16,50902004
	Bk45	48,6629364453256	14,6808345057070			Bk94	49,93538696	16,50921299
	Bk46	48,6617629788815	14,7077984176576			Bk95	49,93507901	16,50913504
	Bk47	48,6622005980461	14,7079974040389		Lanškroun	Bk96	49,93432699	16,50942899
	Bk48	48,6625958885997	14,7067186608910			Bk97	49,93311304	16,51080203
	Bk49	48,6633235216140	14,7074374929070			Bk98	49,93289804	16,51083698
	Bk50	48,6628641095012	14,7089405357837			Bk99	49,93255598	16,51093899
						Bk100	49,93238901	16,510983

Tabulka 70 Ukázka kvantitativních a kvalitativních parametrů izolované DNA buku lesního

ID	C (ng/ul)	koeficient 260/280	ID	C (ng/ul)	koeficient 260/280
BK 1	26,3	2,05	BK 72	21,7	1,64
BK 2	4,8	1,87	BK 73	33,1	1,74
BK 3	27,6	1,63	BK 31	5,2	1,12
BK 41	9,8	1,6	BK 32	25	1,63
BK 42	37,3	1,8	BK 61	13,5	1,7
BK 43	11,5	1,67	BK 62	26,7	1,85
BK 91	17,5	1,76	BK 63	26,9	1,77
BK 92	22,7	1,76	BK 11	16,5	1,87
BK 21	10,9	1,42	BK 12	16,9	1,78
BK 22	19,8	1,57	BK 13	23	1,72
BK 23	23,9	1,64	BK 51	11	1,71
BK 71	9,6	1,23	BK 52	15,1	1,38

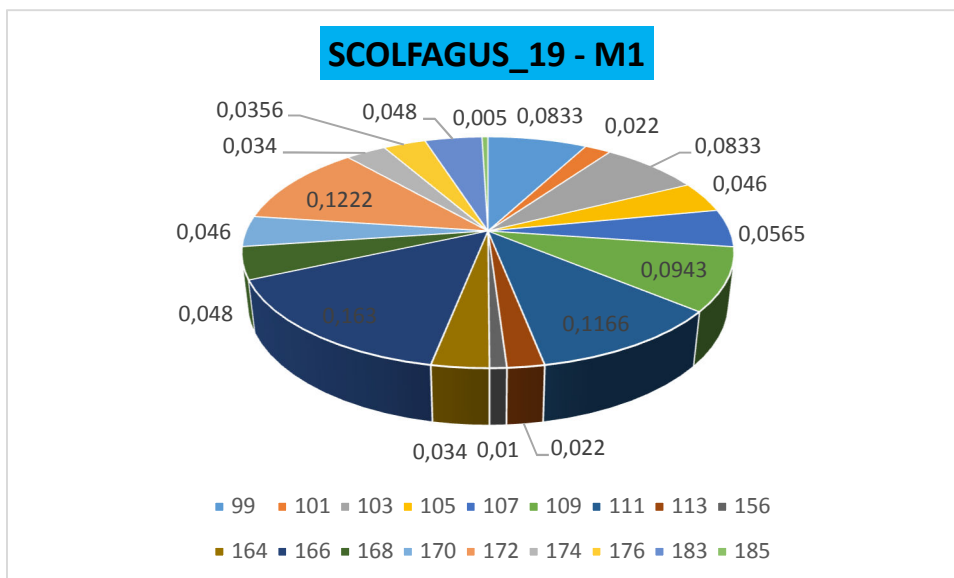
### 16.2.1. Charakteristika jednotlivých mikrosatelitových lokusů buku lesního

První pozorovaný lokus SFC0036 obsahuje alely, které se vyskytují od hodnot 96 po 116 bp. Tento lokus je naznačen modrou barvou. Dominantní zastoupení v tomto lokusu zastávají alely o délce 99 a 112 bp, v závěsu potom co do četnosti se vyskytují alely 103 a 106 bp. Tento lokus se řadí mezi velice polymorfní lokusy a celkově obsahuje 16 alel, které byly na vzorcích detekovány.



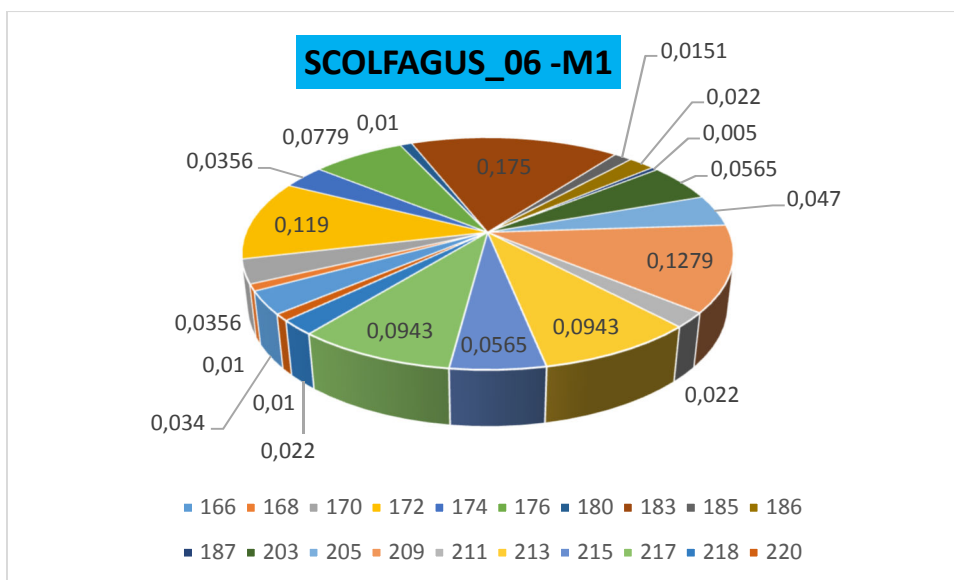
Obrázek 41 Lokus SFC0036 - M1

Další modře naznačený lokus s názvem SCOLFAGUS\_19 je také řazen mezi velmi polymorfní lokusy. Lokus obsahuje alely v rozmezí hodnot 99 po 185 bp. Dominantní zastoupení v tomto lokusu zastávají alely o délce 166 a 111 bp. Celkem je na tomto lokusu detekováno 18 alel.



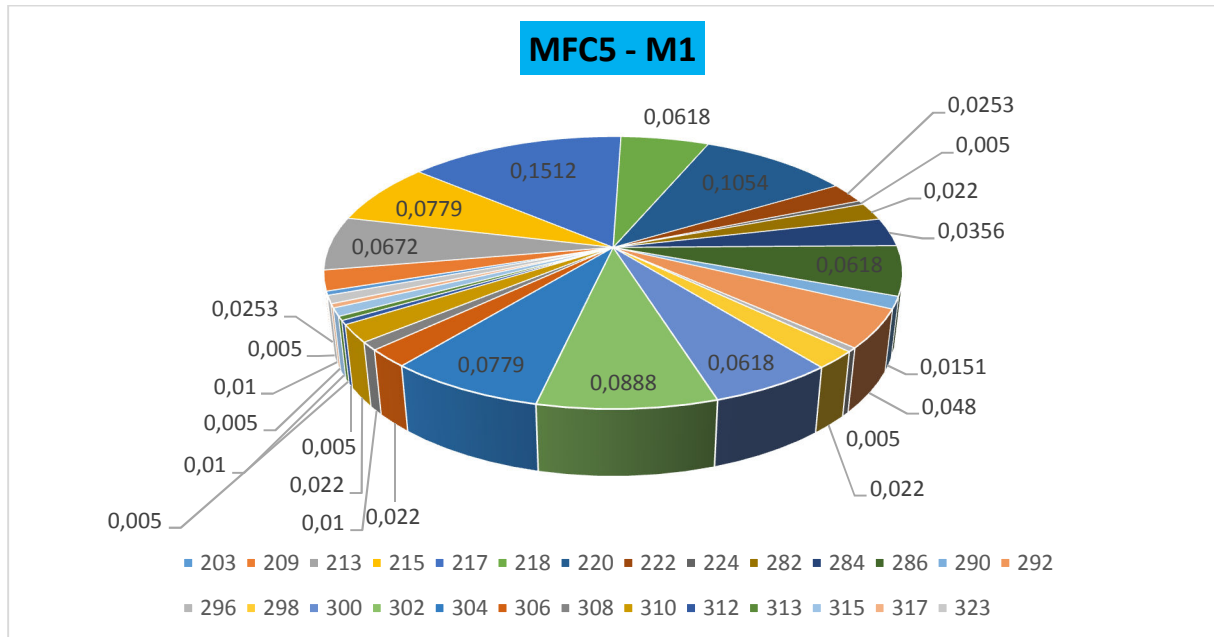
Obrázek 42 Lokus SCOLFAGUS\_19 - M1

Lokus s názvem SCOLFAGUS\_06 je naznačen modrou fluorescenční barvou. Vyskytuje se od hodnot 166 až 220 bp. Z grafu je patrné, že tento lokus je taktéž vysoce polymorfní, obsahuje 20 detekovaných alel, z nichž nejvíce zastoupené jsou alely o hodnotách 217 a 183.



Obrázek 43 Lokus SCOLFAGUS\_06 - M1

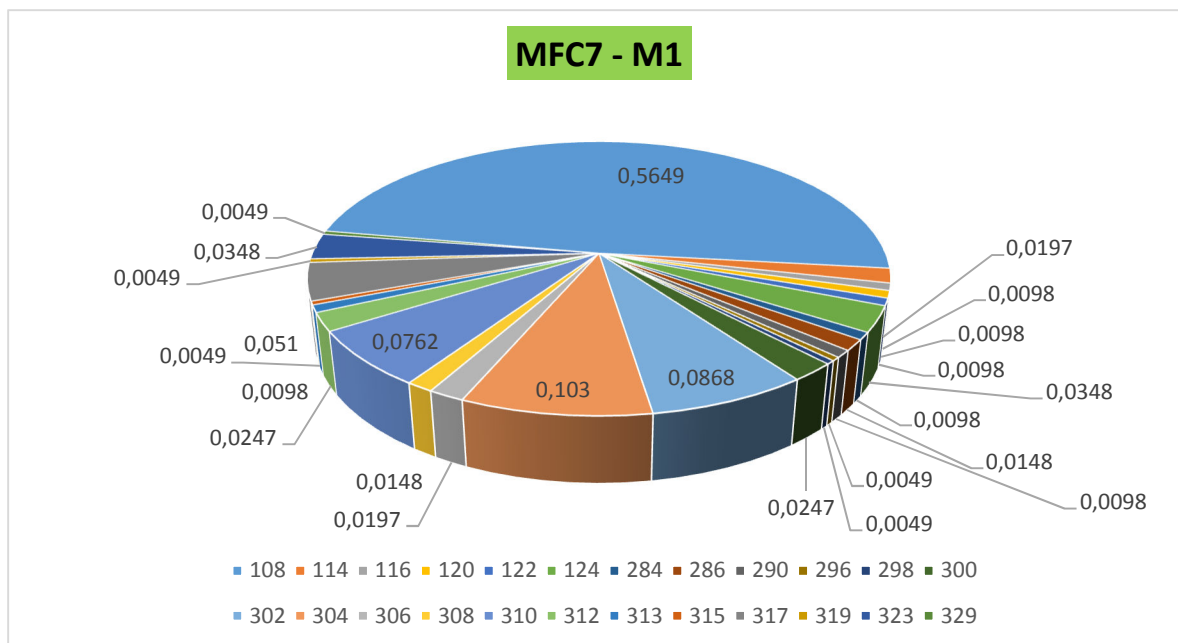
Poslední z modře naznačených lokusů, které se sdružují do prvního multiplexu, se nazývá MFC5. Všechny modře značené lokusy jsou vysoce polymorfní, tento lokus se zastoupením 27 detekovaných alel je nejpolymorfnější. Nejčastěji se v populaci nacházejí alely 217 se zastoupením okolo 15% a 220 se zastoupením 10%. Obsahuje alely v rozmezí od 203 do 323 bp.



Obrázek 44 Lokus MFC5 - M1

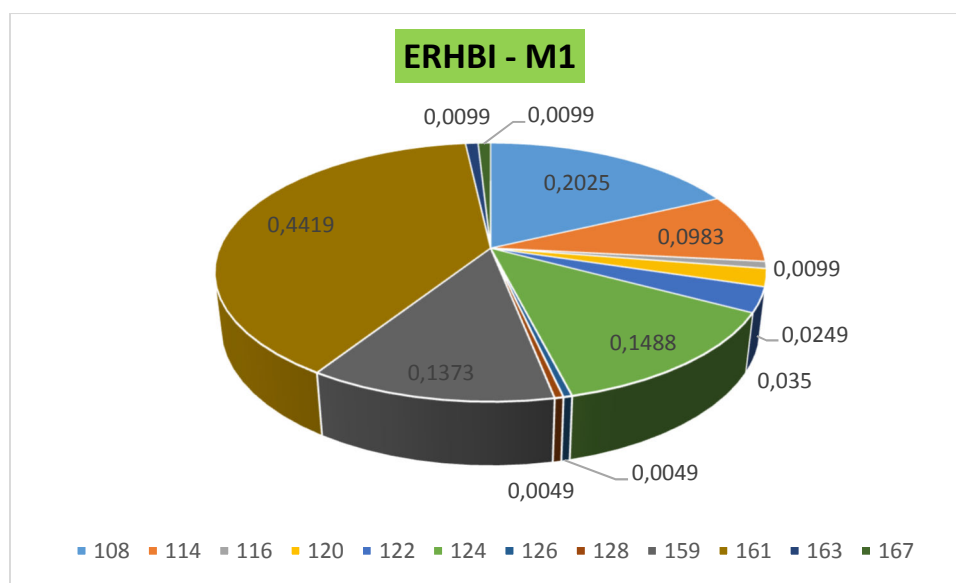
První zeleně fluorescenčně naznačený lokus s názvem MFC7 patří také do multiplexu 1. Obsahuje celkem 24 detekované alely, díky čemuž se řadí mezi vysoce polymorfní lokusy. Dominantní alela s více jak 50% zastoupením je alela s hodnotou 108, ostatní alely se nacházejí v rozmezí od zmíněné hodnoty 108 po 329 bp.





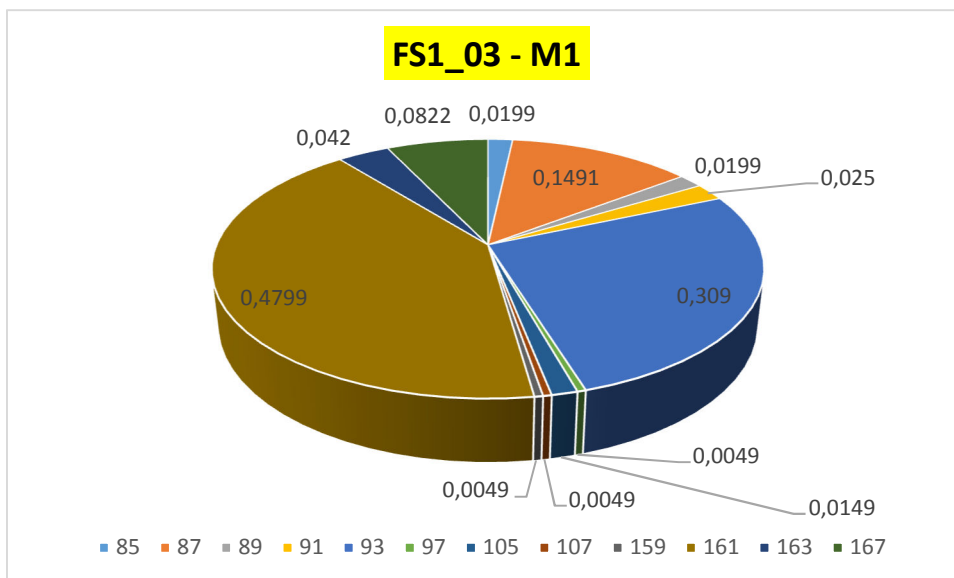
Obrázek 45 Lokus MFC7 - M1

Lokus s názvem ERHBI je zeleně naznačen. Tento lokus obsahuje alely v rozmezí hodnot od 108 do 167 bp. Patří mezi středně polymorfní lokusy díky počtu 12 detekovaných alelám. Dominantní alelou pro tento lokus je alela délky 161 bp.



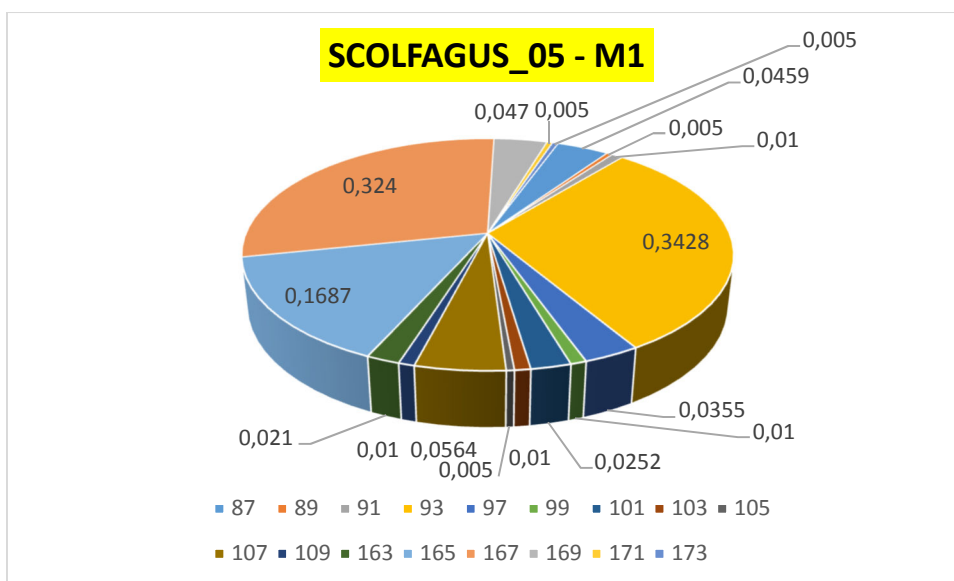
Obrázek 46 Lokus ERHBI - M1

Lokus s názvem FS1\_03 obsahuje alely v rozmezí hodnot 85 až 167 bp. Tento lokus patřící do prvního multiplexu je žlutě fluorescenčně naznačený. Alely nabývají lichých hodnot. Nejčetněji zastoupeny jsou alely 161 a 93, další co do pořadí četnosti se řadí detekované alely 87 a 167.



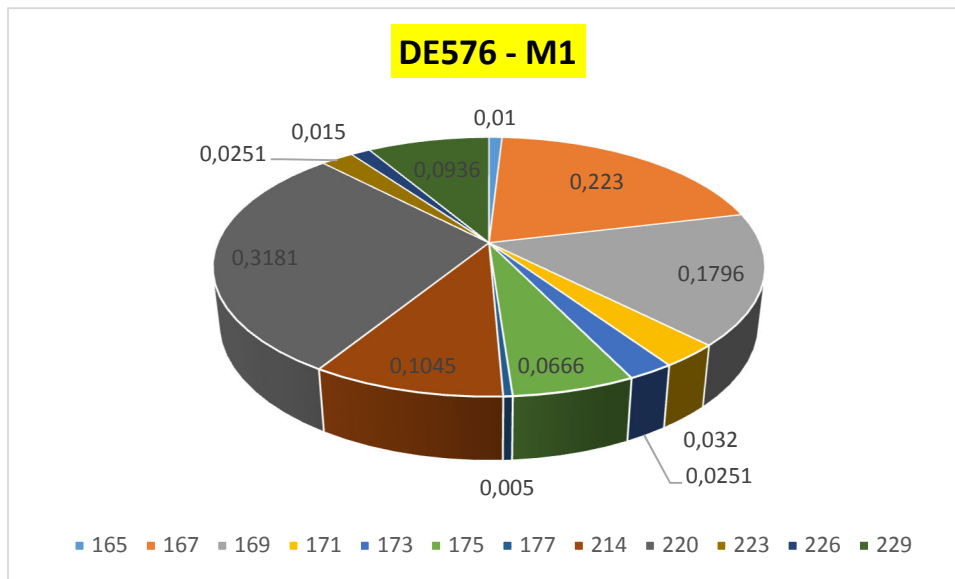
Obrázek 47 Lokus FS1\_03 - M1

Žlutě naznačený lokus s názvem SCOLFAGUS\_05 patří mezi vysoce polymorní lokusy. Tento lokus obsahuje alely o hodnotách 87 až 173. Celkově je detekováno 17 alel lichých hodnot. Mezi nejčetnější patří alely 93, 167 a 165 bp.



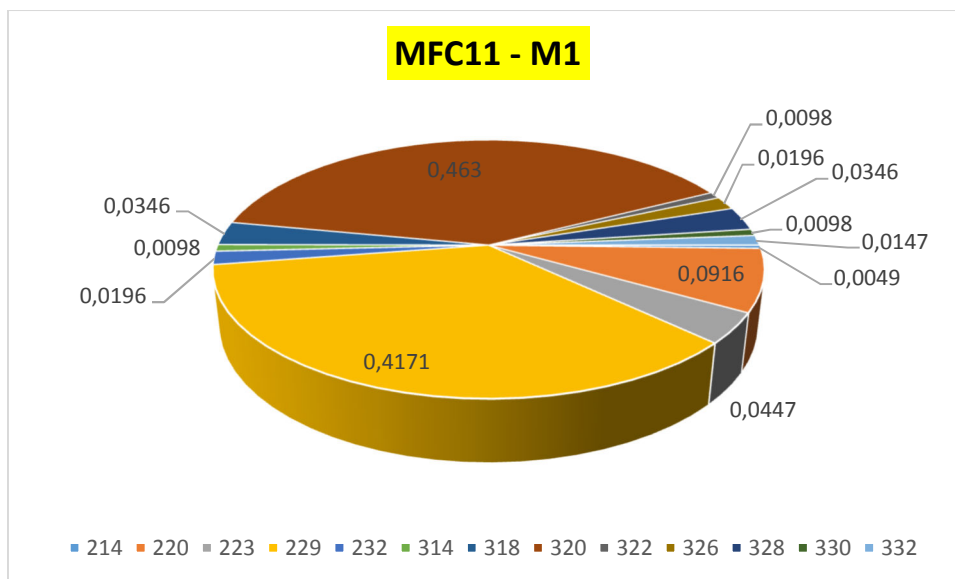
Obrázek 48 Lokus SCOLFAGUS\_05 - M1

Lokus s názvem DE576 je žlutě naznačen a patří do prvního multiplexu. Obsahuje celkem 12 alel v rozmezí hodnot 165 až 229 bp. Mezi 3 nejvíce zastoupené alely patří 220, 167 a alela 169 bp.



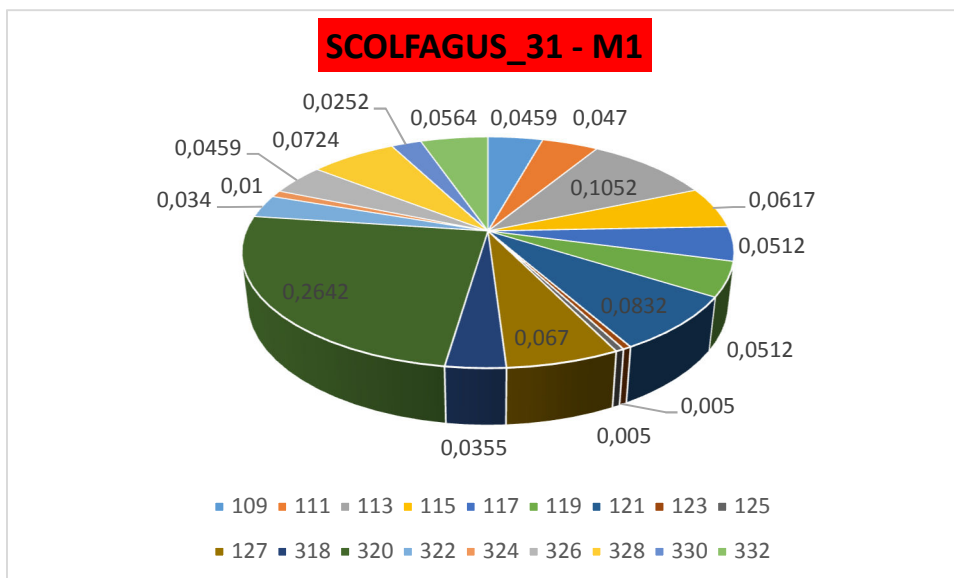
Obrázek 49 Lokus DE576 - M1

Poslední žlutě naznačený lokus s názvem MFC11 patří také do multiplexu 1. Tento lokus vylišuje celkem 13 alel v hodnotách od 214 do 332 bp. Lze jej hodnotit jako středně polymorfní lokus, který obsahuje dvě často se opakující alely o délkách 320 a 229 bp.



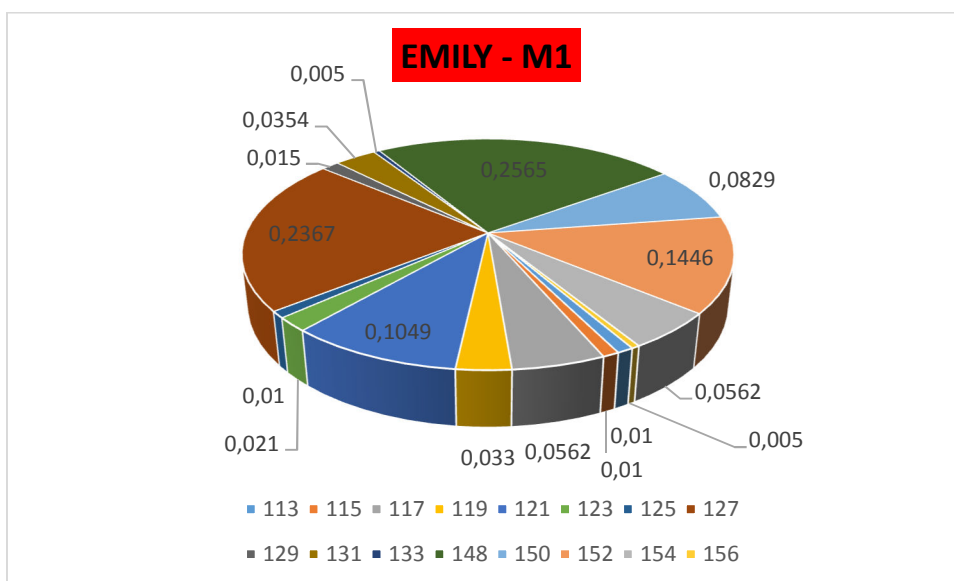
Obrázek 50 Lokus MFC11 - M1

První červeně naznačený lokus s názvem SCOLFAGUS\_31 je řazen mezi vysoce polymorfní. Vylišuje alel v hodnotách od 109 po 332 bp. Jedná se o 18 detekovaných hodnot z nich nejčetnější s více jak 25% zastoupením je alela o délce 320 bp.



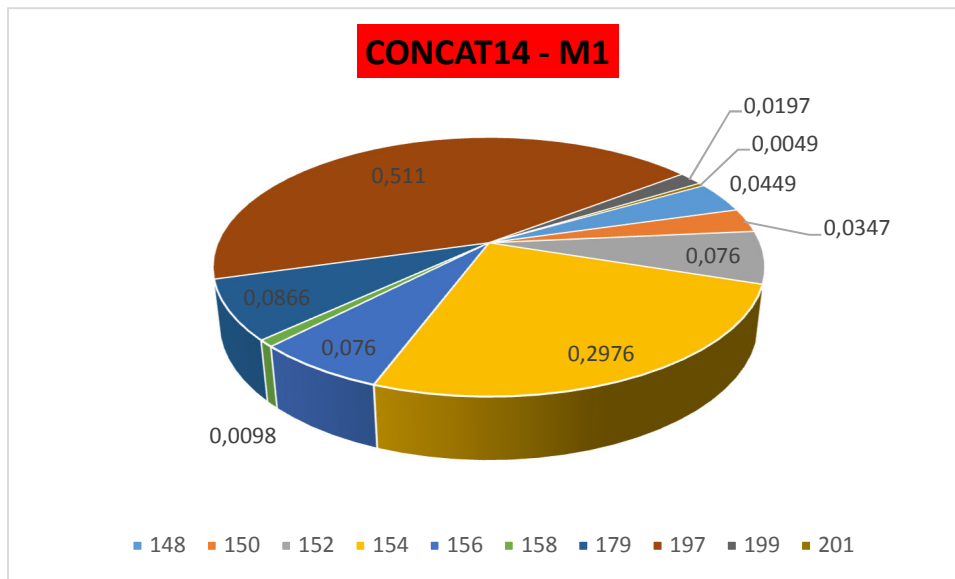
Obrázek 51 Lokus SCOLFAGUS\_31 - M1

Lokus s názvem EMILY patří do multiplexu 1 je červeně fluorescenčně naznačený. Tento lokus je považován za vysoce polymorní. Obsahuje 16 alel v rozmezí délek 113 až 156 bp. Jako dominantní se projeví alely o délkách 148, 127, 152 a 121 bp.



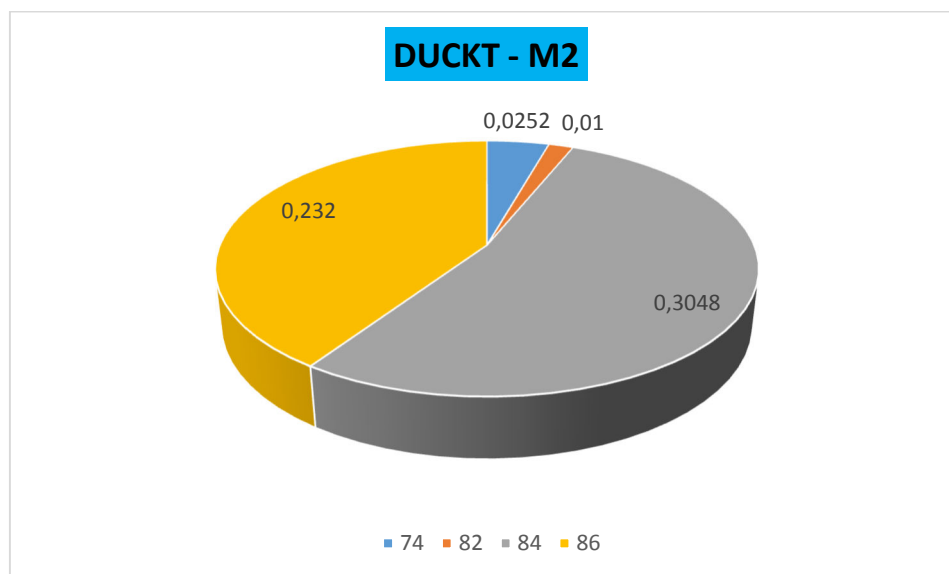
Obrázek 52 Lokus EMILY - M1

Poslední lokus patřící do multiplexu 1 je CONCAT14. Tento lokus je červeně naznačen. Řadí se mezi středně polymorní lokusy, protože obsahuje celkem 10 detekovaných lokus. Jednotlivé alely se nacházejí v rozmezí hodnot od 148 do 201 bp. Nejčetnější alely na tomto lokusu nabývají hodnot 197 a 154 bp.



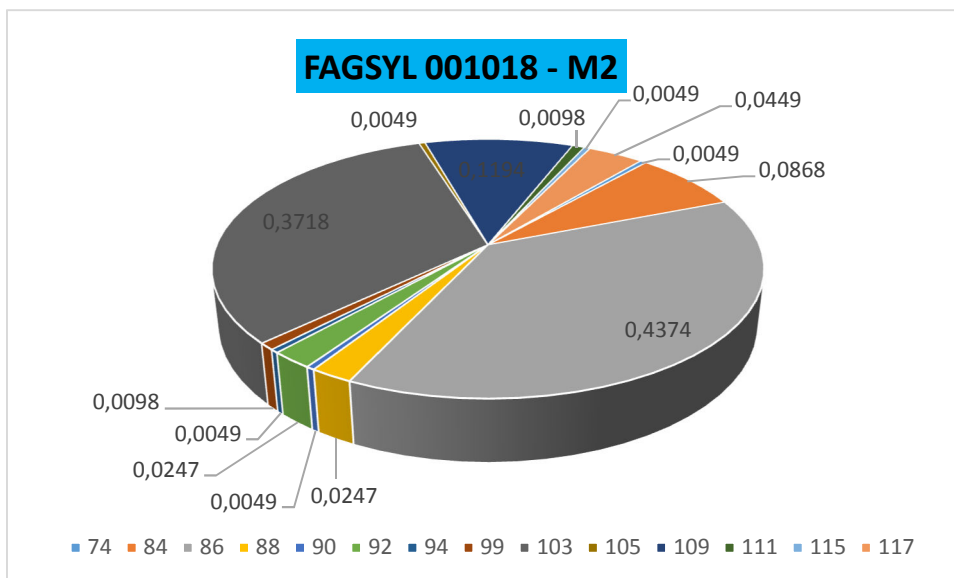
Obrázek 53 Lokus CONCAT14- M1

První lokus z multiplexu 2 se nazývá DUCKT. Lokus je modře naznačen. Obsahuje 4 detekované alely o hodnotách 74, 82, 84 a 86 bp. Nejčetněji zastoupená je alel 84 bp.



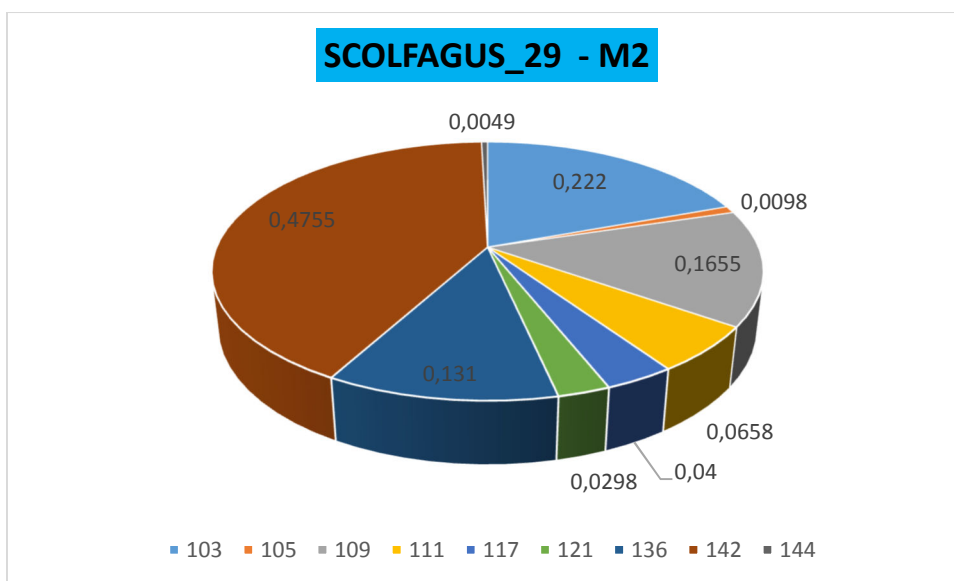
Obrázek 54 Lokus DUCKT – M2

Další modře naznačený lokus se nazývá FAGSYL001018A patří do druhého multiplexu. Obsahuje alely o hodnotách od 74 do 117 bp. Tento lokus spadá do kategorie středně polymorfních lokusů díky počtu 14 detekovaných alel. Mezi nejvíce zastoupené patří alely 86, 103 a 109 bp.



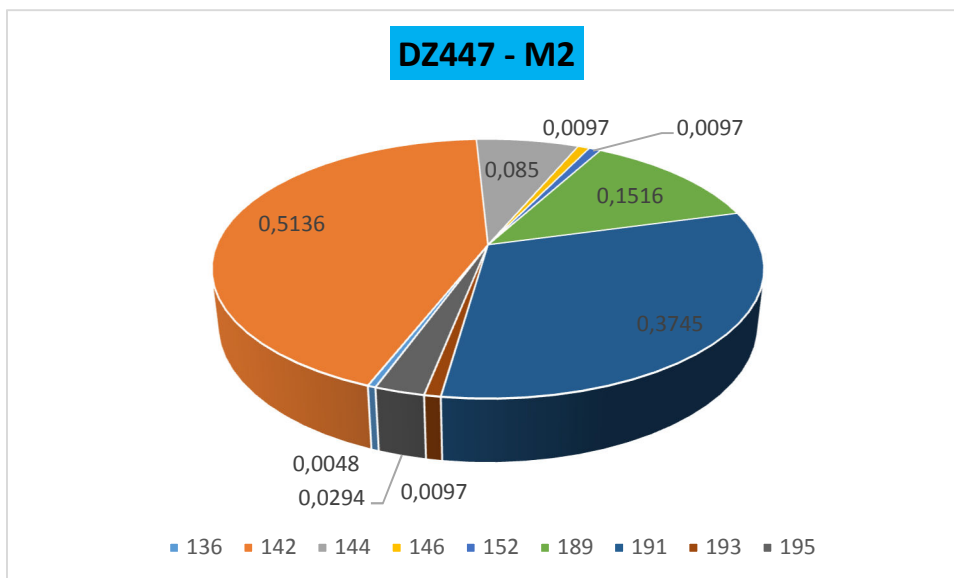
Obrázek 55 LokusFAGSYL001018– M2

Lokus s názvem SCOLFAGUS\_29 je modře fluorescenčně naznačen. Vylisuje alely o délkách od 103 do 144 bp. Jedná se středně polymorfní lokus, který detekuje 9 alel, z nich nejvíce zastoupená je alela o délce 142 bp.



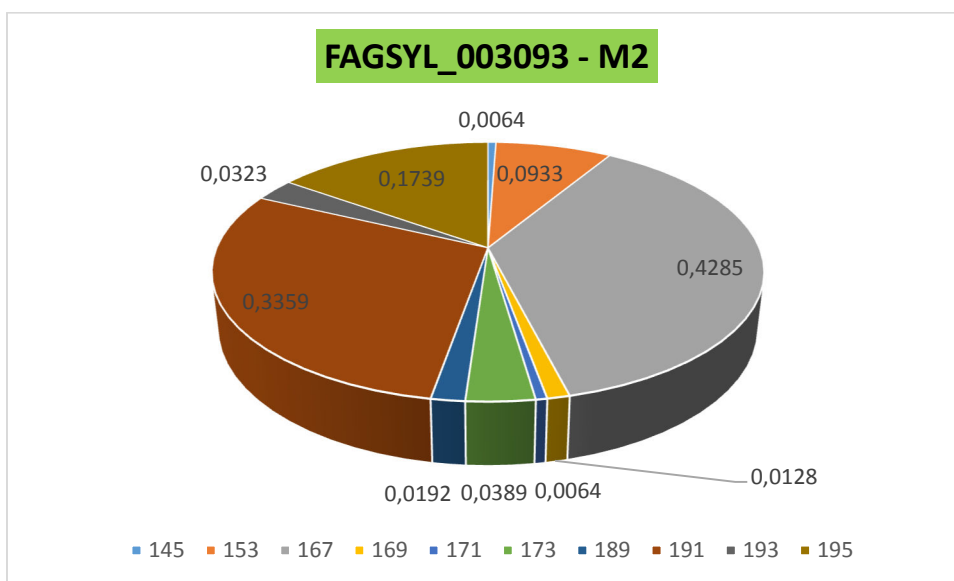
Obrázek 56 Lokus SCOLFAGUS\_29 – M2

Poslední lokus, který je modře naznačen se nazývá DZ447. Tento lokus patří do multiplexu 2 a řadí se mezi středně polymorfní lokusy. Obsahuje celkem 9 detekovaných alel v hodnotách od 136 do 195 bp. Mezi nejčetnější alely patří 142 a 191 bp.



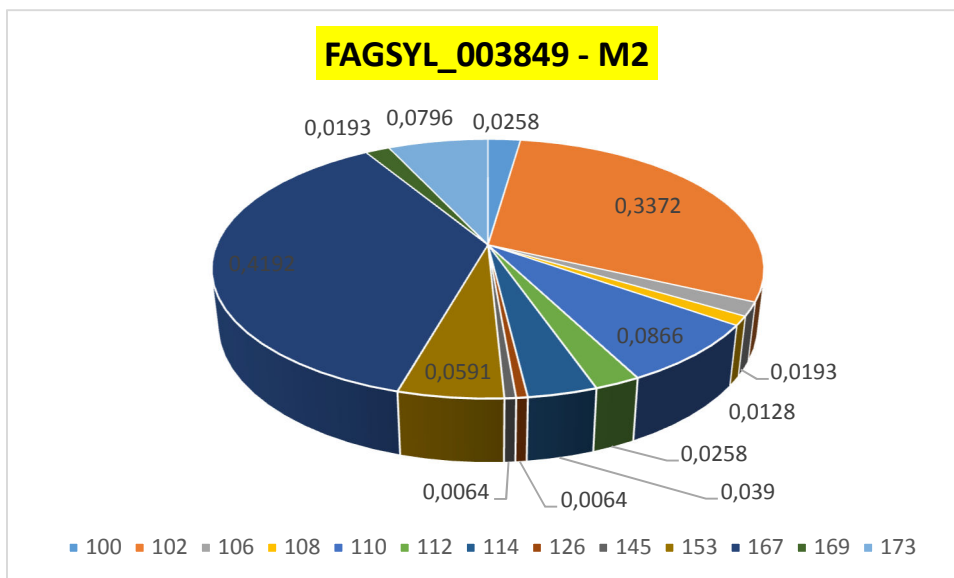
Obrázek 57 Lokus DZ447– M2

Lokus s názvem FAGSYL\_003093 je zeleně naznačen. Vyskytuje se od hodnot 145 až 195 bp. Alely se vždy nachází na liché pozici a v případě nejasné alely. Na grafu je patrné, že tento lokus je středně polymorfní, bylo na něm detekováno 10 alel, z nichž nejvíce zastoupená je alela o délce 167 bp.



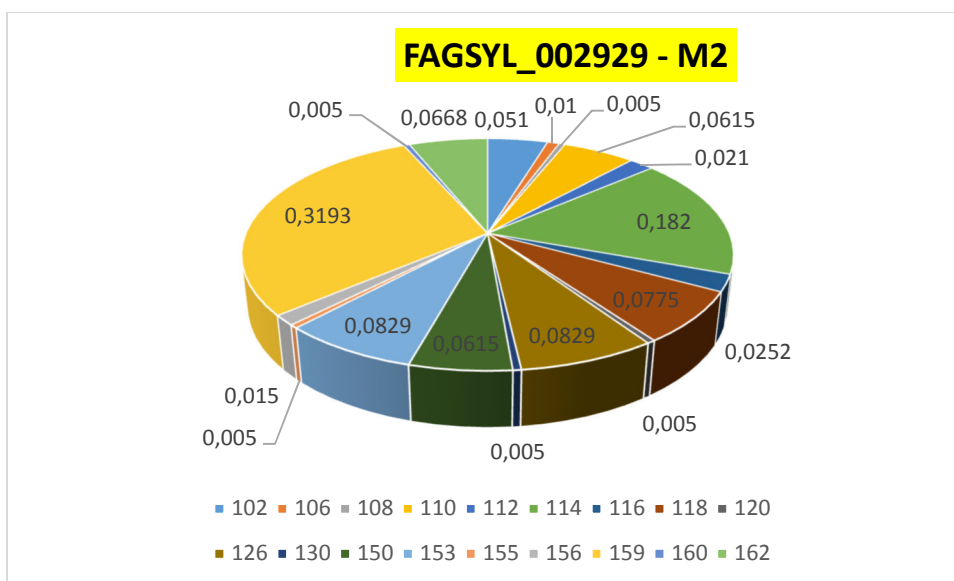
Obrázek 58 Lokus FAGSYL\_003093 – M2

Lokus s názvem FAGSYL 003849 je fluorescenčně žlutě naznačen a patří do lutiplexu 2. Patří mezi středně polymorfní lokusy se svým počtem 13 detekovaných alel. Alely se cházejí v rozmezí hodnot od 100 do 173 bp. Mezi dvě nejčastější alely se řadí alely o hodnotách 167 a 102 bp.



Obrázek 59 Lokus FAGSYL\_003849 – M2

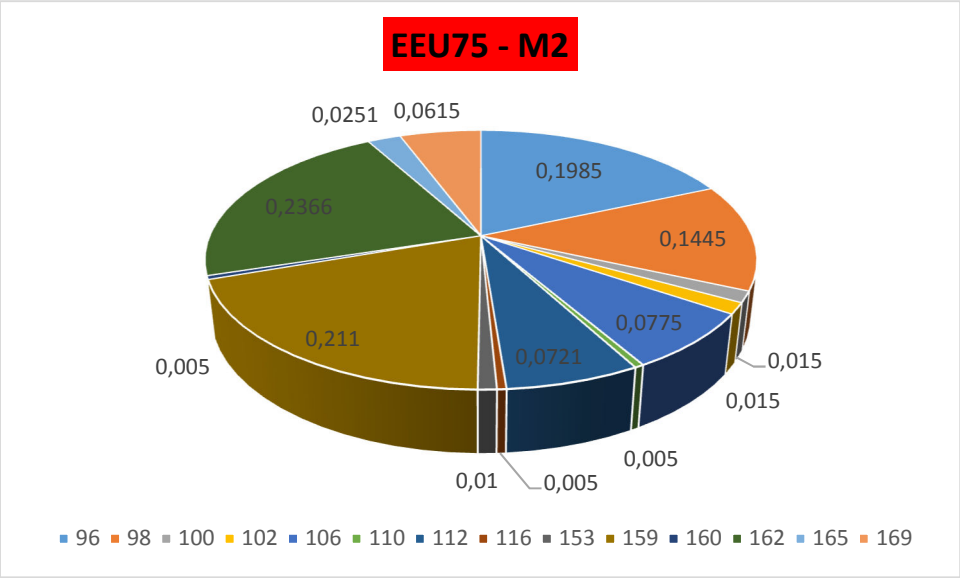
Druhý žlutě naznačený lokus z multiplexu 2 se nazývá FAGSYL 002929. Vylisuje celkem 18 detekovaných alel, díky čemuž se tento lokus řadí mezi vysoce polymorfní lokusy. Nejvíce zastoupené alely jsou 159 a 114 bp.



Obrázek 60 Lokus FAGSYL\_002929 – M2

Poslední lokus se nazývá EEU75. Tento lokus je naznačen červenou fluorescenční barvou. Obsahuje alely v hodnotách od 96 do 169 bp. Celkem se na lokusu EEU75 nachází 14 detekovaných alel. Reprezentuje středně polymorfní lokus, který má rovnoměrné zastoupení jednotlivých alel.





Obrázek 61 Lokus EEU75– M2

### 16.3. Dub zimní

Tabulka 71 Číselné vymezení vzorků dubu zimního rámci geografických lokalit

DBZ	PLO	LS	lokality (číslo GZ)
1-10	8	Křivoklát	LS Křivoklát (dříve GZ 3 Bušohrad)
11-20	6	Plasy	57 Doubrava
21-30	10	Hluboká	21-1 Hluboká
31-40	16	Jinřichův Hradec	024-2 Vojířov (GZ není vyhlášena pro DBZ)
41-50	36	Buchlovice	152-1 Buchlov - Cimburk
51-60	38	Luhačovice	LS Luhačovice Šarovy
61-70	17	Nasavrky	LS Nasavrky
71-80	33	Náměšť	LS Náměšť (bývalá GZ Bučín)
81-90	29	Šternberk	LS Šternberk
91-100	8	Nižbor	LS Nižbor

Tabulka 72 Geografické souřadnice zájmových jedinců dubu zimního

LS	ID	Zeměpisná šířka	Zeměpisná délka	LS	ID	Zeměpisná šířka	Zeměpisná délka
Křivoklát	Db1	49,9731809645891	13,8341409992426	Luhačovice	Db51	49,12956798	17,61202401
	Db2	49,9739510100334	13,8339830003678		Db52	49,12962397	17,61218
	Db3	49,9744150321930	13,8349159900099		Db53	49,129587	17,61274603
	Db4	49,9746039602905	13,8337319623678		Db54	49,12969597	17,61297503
	Db5	49,9742290377616	13,8328490126878		Db55	49,12989101	17,613344
	Db6	49,9744669999927	13,8317209761589		Db56	49,13226804	17,60645097
	Db7	49,9739009700715	13,8310629967600		Db57	49,13306197	17,60627101
	Db8	49,9733409751206	13,8309029862284		Db58	49,13289702	17,606298
	Db9	49,9729920364916	13,8301679771393		Db59	49,13262703	17,60616699
	Db10	49,9733780231326	13,8351589813828		Db60	49,13256903	17,60572703
Plasy	Db11	49,9180629942566	13,4519459959119	Nasavrky	Db61	50,11762245	15,13034114
	Db12	49,9176419712603	13,4516099654138		Db62	50,00591724	15,6020842
	Db13	49,9169269949197	13,4511850029230		Db63	50,00492156	15,60276666
	Db14	49,9164479691535	13,4510229807347		Db64	50,00455074	15,6031969
	Db15	49,9159380141645	13,4512290079146		Db65	50,00379193	15,60373569
	Db16	49,9155800230801	13,4491359628736		Db66	50,00339203	15,60417331
	Db17	49,9170389771461	13,4507740382105		Db67	50,00399661	15,60432242
	Db18	49,9174920190125	13,4506550151854		Db68	50,00449928	15,60451789
	Db19	49,9185710214078	13,4505479782819		Db69	50,00496866	15,603818
	Db20	49,9192920327186	13,4498449880629		Db70	50,00572463	15,60300889
Hluboká	Db21	49,1036773659288	14,5057898573577	Náměšť	Db71	49,13995734	16,45824943
	Db22	49,1034735180437	14,5052053872495		Db72	49,1393909	16,45973403
	Db23	49,1033981647342	14,5051261782646		Db73	49,13916064	16,46078026
	Db24	49,1039612609893	14,5052729453891		Db74	49,13914111	16,46150622
	Db25	49,1035581752657	14,5061228703707		Db75	49,13962802	16,46205976
	Db26	49,1268804017454	14,5184000115841		Db76	49,14012968	16,46201324
	Db27	49,1265603806823	14,5179836824536		Db77	49,14016781	16,4610458
	Db28	49,1265036351978	14,5167595054954		Db78	49,1400876	16,46045982
	Db29	49,1271366365253	14,5158741250634		Db79	49,14004812	16,45968885

	Db30	49,1273933742195	14,5149604137986			Db80	49,13999632	16,45904873
Jindřichův Hradec	Db31	49,0319540072232	14,9763100035488	Šternberk		Db81	49,77368622	17,26916864
	Db32	49,0320809930562	14,9762720335274			Db82	49,773734	17,26861099
	Db33	49,0322669874876	14,9757950194180			Db83	49,7735102	17,26812031
	Db34	49,0324639622122	14,9744130112230			Db84	49,77390566	17,26804429
	Db35	49,0333419665694	14,9725979939103			Db85	49,77265734	17,26186892
	Db36	49,0326930396258	14,9725199583917			Db86	49,77231486	17,26212138
	Db37	49,0339540131390	14,9726440105587			Db87	49,77206516	17,26189842
	Db38	49,0266109630465	14,9904729891568			Db88	49,77183323	17,26124614
	Db39	49,0269210096448	14,9909719638526			Db89	49,77201286	17,26096971
	Db40	49,0271530207246	14,9909329880028			Db90	49,77221645	17,26155334
Buchlovice	Db41	49,0988529939204	17,2903679776936	Nižbor		Db91	50,005027	14,01388999
	Db42	49,0994160063564	17,2904819715768			Db92	50,00468502	14,01405402
	Db43	49,0996709838509	17,2902989946305			Db93	50,00461704	14,01473698
	Db44	49,0998950321227	17,2897140216082			Db94	50,00465702	14,01371799
	Db45	49,0996910165995	17,2891680244356			Db95	50,00439903	14,01352203
	Db46	49,0995780285447	17,2888640128076			Db96	50,00426299	14,01315196
	Db47	49,0993839874863	17,2883949615061			Db97	50,00398203	14,01305599
	Db48	49,0996610093861	17,2881770320236			Db98	50,00363099	14,01316697
	Db49	49,0994630288332	17,2896889597177			Db99	50,00309497	14,01372897
	Db50	49,0994829777628	17,2900320310145			Db100	50,00258602	14,01439701

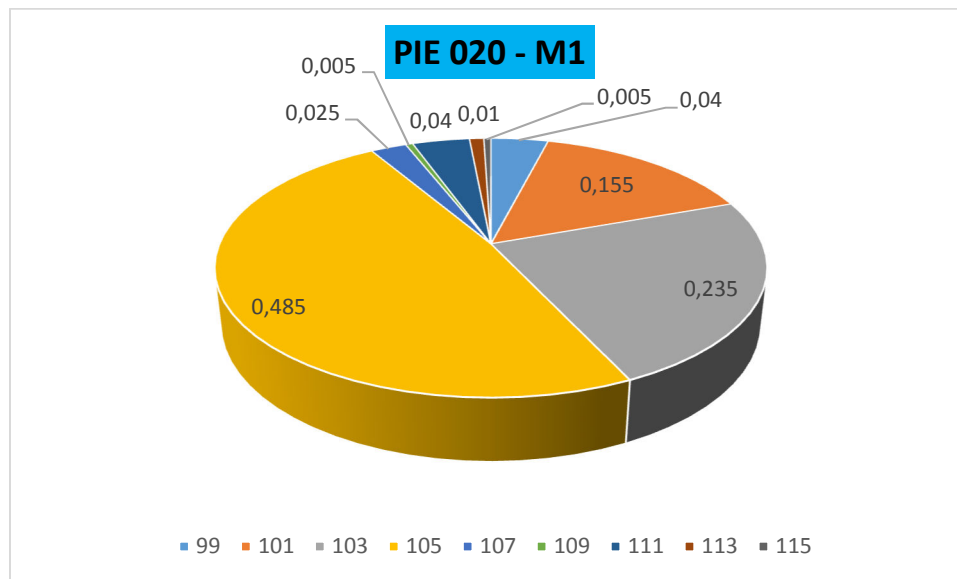
Tabulka 73 Ukázka kvantitativních a kvalitativních parametrů izolované DNA dubu zimního

ID	C (ng/ ul)	koeficient 260/280	ID	C (ng/ ul)	koeficient 260/280
lcr_db 1	82,60	1,73	lcr_db 51	39,10	1,76
lcr_db 2	48,80	1,7	lcr_db 52	56,90	1,76
lcr_db 3	71,90	1,79	lcr_db 53	56,90	1,69
lcr_db 4	41,80	1,72	lcr_db 54	59,20	1,78
lcr_db 5	63,70	1,75	lcr_db 55	40,00	1,7
lcr_db 6	63,50	1,81	lcr_db 56	32,20	1,65
lcr_db 7	149,80	1,79	lcr_db 57	48,40	1,71
lcr_db 8	55,80	1,74	lcr_db 58	79,90	1,79
lcr_db 9	72,20	1,71	lcr_db 59	42,10	1,68
lcr_db 10	43,00	1,76	lcr_db 60	63,40	1,57
lcr_db 11	115,80	1,82	lcr_db 61	36,00	1,68
lcr_db 12	45,80	1,75	lcr_db 62	49,00	1,75
lcr_db 13	48,60	1,66	lcr_db 63	51,90	1,71
lcr_db 14	62,40	1,72	lcr_db 64	56,50	1,69
lcr_db 15	57,90	1,79	lcr_db 65	26,30	1,65
lcr_db 16	77,80	1,76	lcr_db 66	34,90	1,56
lcr_db 17	95,10	1,55	lcr_db 67	40,20	1,63
lcr_db 18	77,10	1,8	lcr_db 68	60,00	1,56
lcr_db 19	57,90	1,66	lcr_db 69	30,30	1,61

lcr_db 20	33,20	1,61	lcr_db 70	56,30	1,72
lcr_db 21	48,30	1,72	lcr_db 71	69,60	1,74
lcr_db 22	57,90	1,8	lcr_db 72	41,60	1,67
lcr_db 23	66,20	1,78	lcr_db 73	59,6	1,67
lcr_db 24	48,00	1,71	lcr_db 74	57,70	1,69
lcr_db 25	48,30	1,67	lcr_db 75	28,60	1,7
lcr_db 26	51,00	1,64	lcr_db 76	38,30	1,64
lcr_db 27	70,10	1,76	lcr_db 77	43,40	1,68
lcr_db 28	37,50	1,75	lcr_db 78	50,40	1,68
lcr_db 29	47,90	1,72	lcr_db 79	46,70	1,61
lcr_db 30	69,20	1,68	lcr_db 80	71,30	1,66
lcr_db 31	39,10	1,71	lcr_db 81	19,90	1,62
lcr_db 32	38,70	1,74	lcr_db 82	54,40	1,62
lcr_db 33	78,10	1,72	lcr_db 83	30,30	1,67
lcr_db 34	40,20	1,77	lcr_db 84	70,30	1,68
lcr_db 35	21,40	1,53	lcr_db 85	31,50	1,52
lcr_db 36	64,60	1,76	lcr_db 86	34,30	1,64
lcr_db 37	31,60	1,61	lcr_db 87	27,70	1,55
lcr_db 38	25,50	1,61	lcr_db 88	53,50	1,68
lcr_db 39	40,00	1,69	lcr_db 89	38,00	1,67
lcr_db 40	30,20	1,65	lcr_db 90	60,80	1,63
lcr_db 41	32,20	1,7	lcr_db 91	27,60	1,64
lcr_db 42	24,20	1,55	lcr_db 92	33,00	1,53
lcr_db 43	52,40	1,7	lcr_db 93	17,90	1,65
lcr_db 44	51,20	1,6	lcr_db 94	29,70	1,62
lcr_db 45	62,30	1,69	lcr_db 95	28,30	1,59
lcr_db 46	71,10	1,68	lcr_db 96	32,10	1,57
lcr_db 47	70,70	1,72	lcr_db 97	42,90	1,7
lcr_db 48	25,40	1,54	lcr_db 98	37,80	1,75
lcr_db 49	24,20	1,57	lcr_db 99	24,50	1,73
lcr_db 50	44,50	1,6	lcr_db 100	36,60	1,81

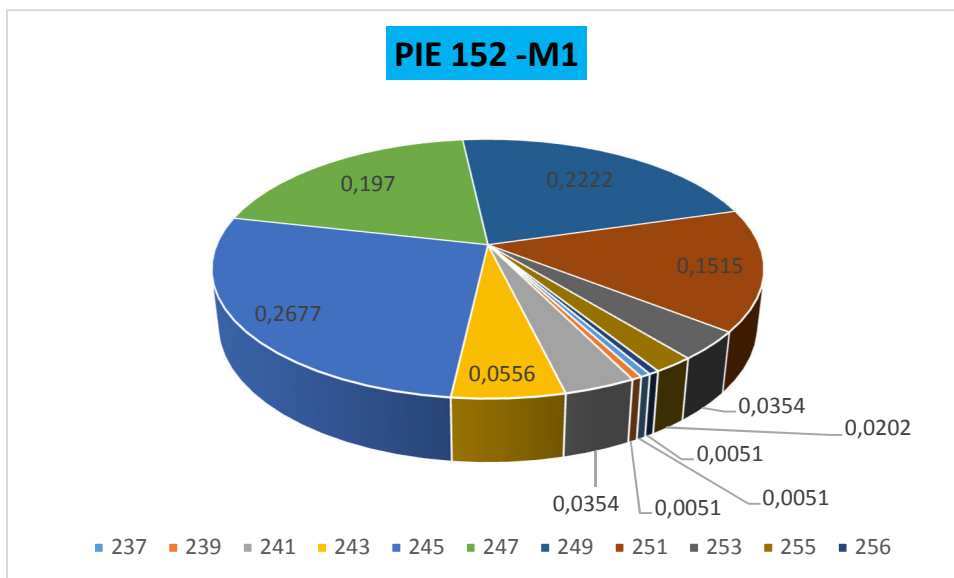
### 16.3.1. Charakteristika jednotlivých mikrosatelitových lokusů dubu zimního

Lokus s názvem PIE 020 je prvním modře fluorescenčně naznačený mikrosatelitový primer. Obsahuje alely v rozsahu od 99 do 115 bp v celkovém množství 9 alel. Všechny detekované alely nabývají lichých hodnot. Nejčetnější detekované lokusy jsou alely 105 a 103 bp.



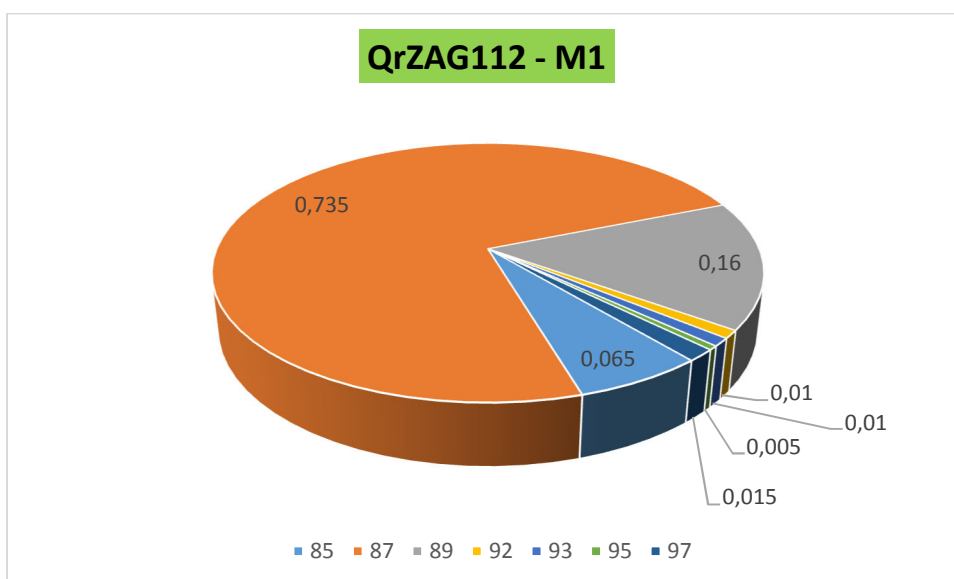
Obrázek 62 Lokus PIE 020 - M1

Lokus PIE 152 je další zástupce modře naznačených markerů, který se nachází v multiplexu 1. Jedná se o středně polymorfní lokus, který obsahuje 11 detekovaných alel. Rozsah all nabývá hodnot od 237 do 256 bp. Nejčastěji byly detekovány alely s hodnotami 245, 249, 251 a 247 bp.



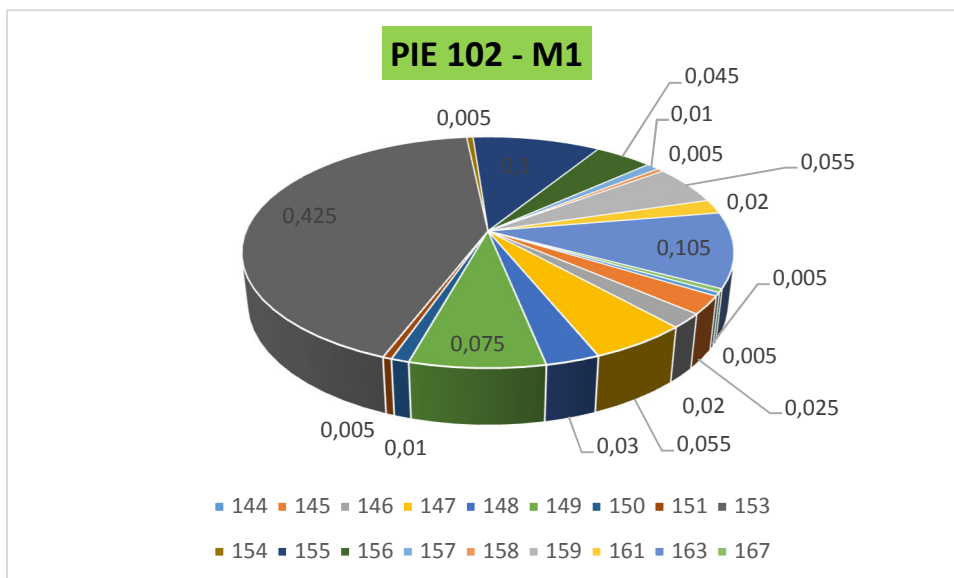
Obrázek 63 Lokus PIE 152 - M1

Lokus s názvem QrZAG112 je zeleně označený mikrosatelitový primer. Řadí se do mírně polymorfních lokusů díky počtu detekovaných alel 7. Na lokusu se nacházejí alely od 85 do 97 bp. Nejčastěji zastoupená je alel o hodnotě 87 bp.



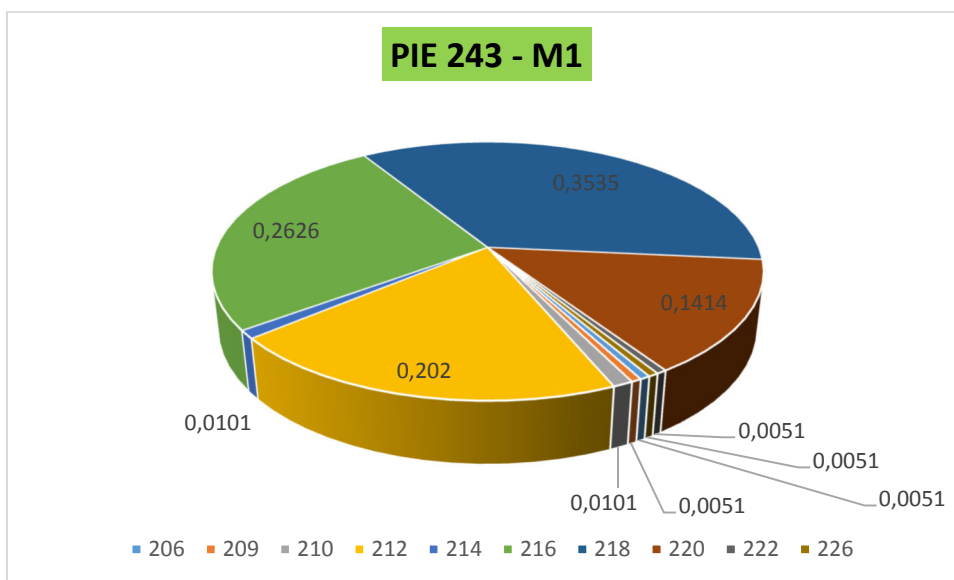
Obrázek 64 Lokus QrZAG112 - M1

Druhý zeleně označený mikrosatelitový primer z multiplexu 1 má název PIE 102. Tento lokus obsahuje celkem 18 detekovaných alel. Díky této početnosti se řadí do vysoce polymorfních lokusů. Alely nabývají hodnot od 144 do 167 bp, přičemž nejčastěji je detekovaná alela s hodnotou 153 bp.



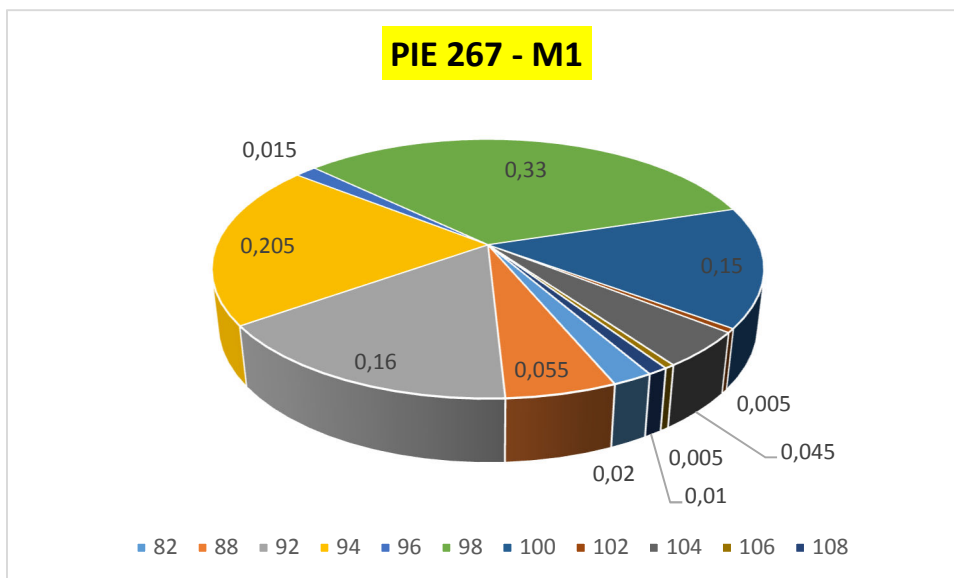
Obrázek 65 Lokus PIE 102 - M1

Lokus PIE 243 uzavírá trojici zeleně naznačených mikrostelitových primerů řazených do multiplexu 1. Tento lokus obsahuje 10 detekovaných alel nabyvajících hodnot od 206 do 226. Jedná se o alely, které jsou detekovány na sudých pozicích. V tomto středně polymorfním lokusu se často vyskytují hodnoty 218, 216, 212 a 220 bp.



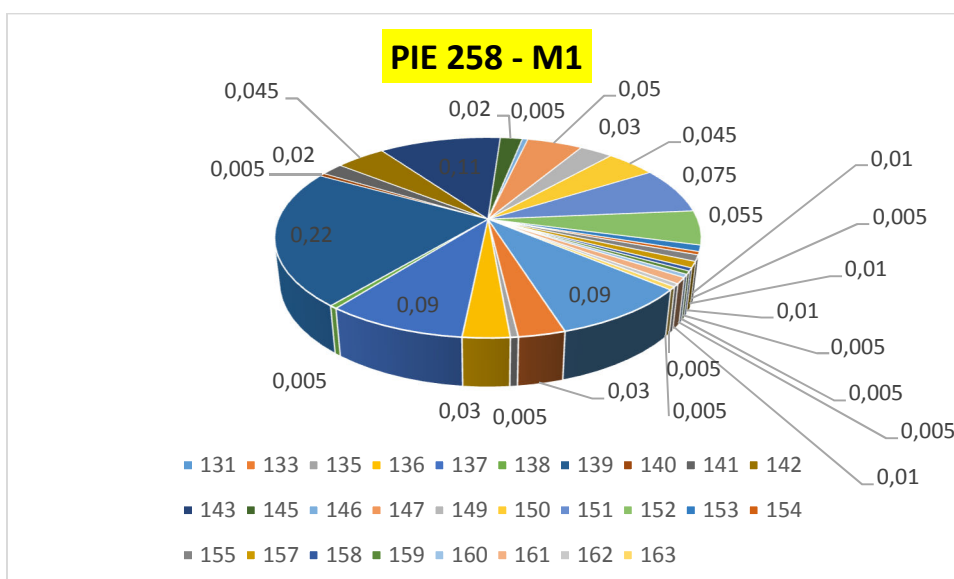
Obrázek 66 Lokus PIE 243 - M1

Lokus s názvem PIE 267 čítá celkem 11 detekovaných alel. Žlutě naznačený lokus patří do multiplexu 1 obsahuje alely od sudých hodnot 82 do 108 bp. Nejčetnější alely jsou 98, 94, 92 a 100 bp.



Obrázek 67 Lokus PIE 267 - M1

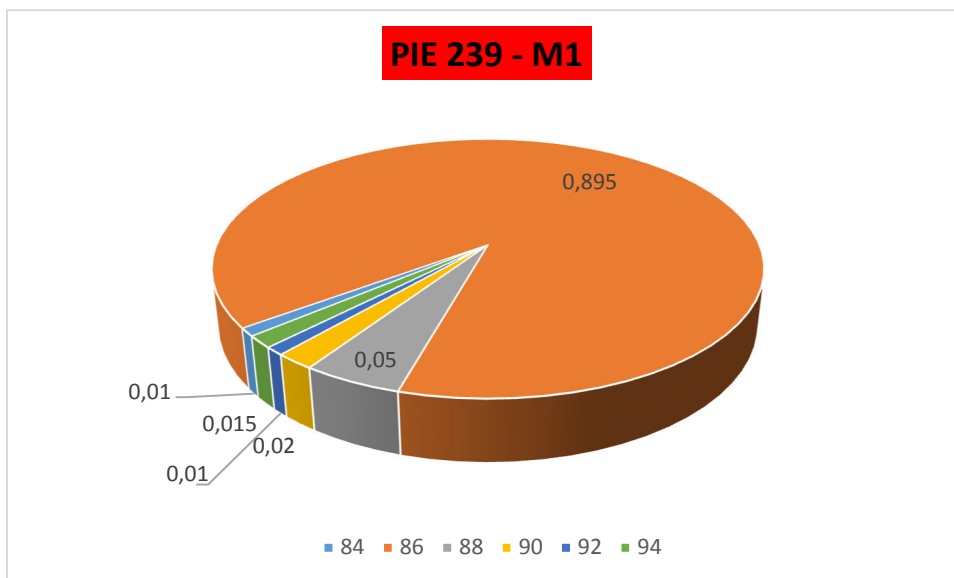
Lokus PIE 258 je žlutě fluorescenčně naznačený. Patří do multiplexu 1 a obsahuje celkem 28 detekovaných alel a řadí se mezi vysoce polymorfní lokusy. Četně se vyskytují alely o hodnotách 140, 143, 131 a 137 bp.



Obrázek 68 Lokus PIE 258 - M1

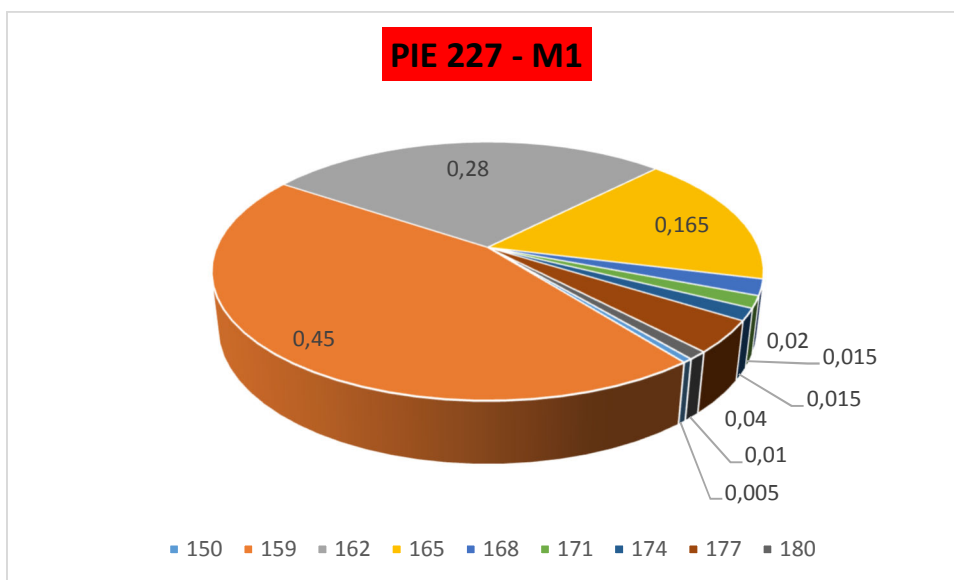
První z červeně naznačených primerů multiplexu 1 nese název PIE 239. Tento lokus se skládá z 6 detekovaných alel, které nabývají hodnot od 84 do 94 bp. Více jak 80 % detekovaných alel představuje alela 86 bp.





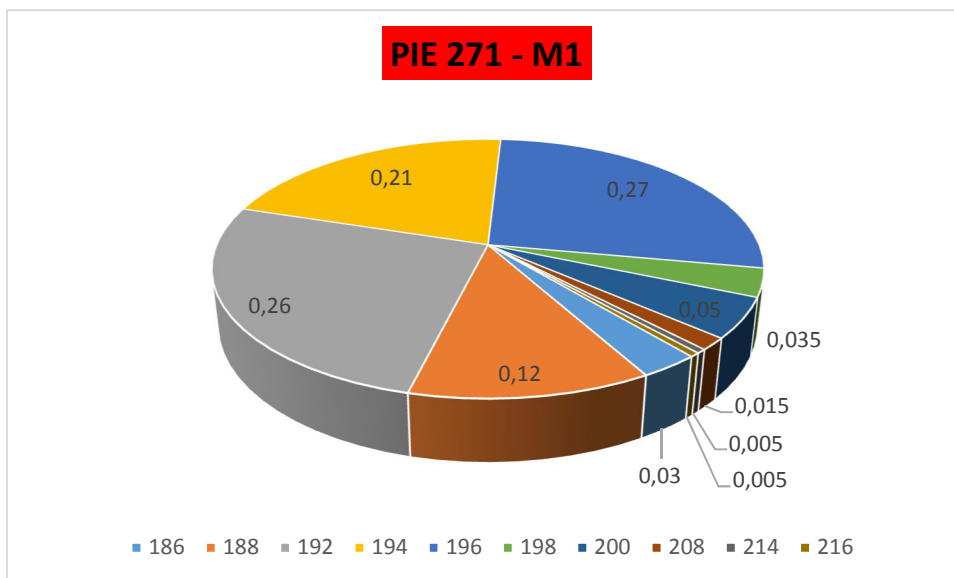
Obrázek 69 Lokus PIE 239 - M1

Lokus s názvem PIE 227 je červeně fluorescenčně naznačen. Řadí se mezi středně polymorfní lokusy. V tomto lokusu se nachází 9 detekovaných alel v rozpětí hodnot 150 až 180 bp. Nejčastěji detekovaná alela je alela 159 bp, dalšími více četnými alelami jsou alely 162 a 165 bp.



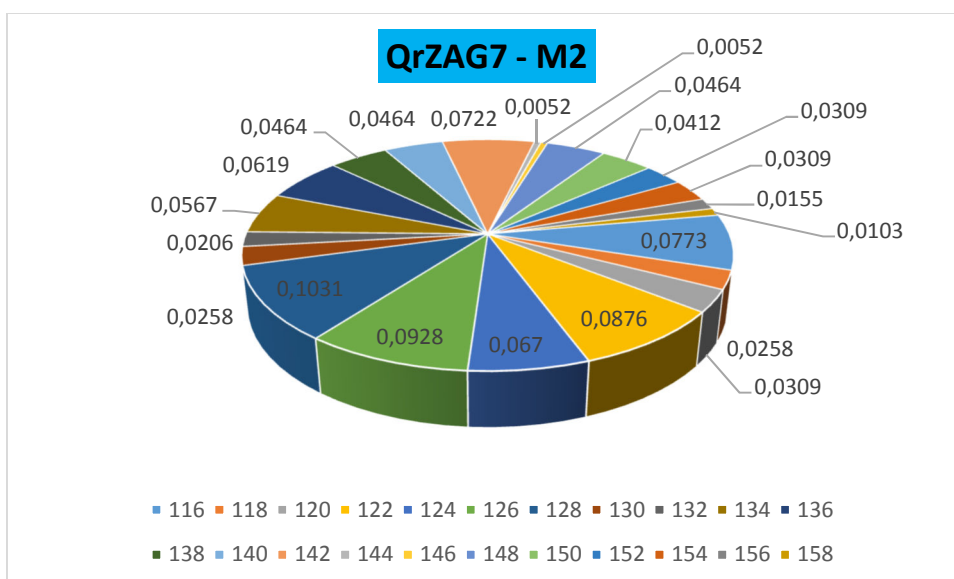
Obrázek 70 Lokus PIE 227 - M1

Poslední červeně naznačený mikrosatelitový primer z multiplexu 1 má název PIE 271. Lokus obsahuje 10 detekovaných alel, proto jej řadíme mezi středně polymorfní lokusy. Hodnoty alel nabývají od 186 do 216 bp. Čtyři nejčastěji zastoupené alely jsou 196, 192, 194 a 188 bp.



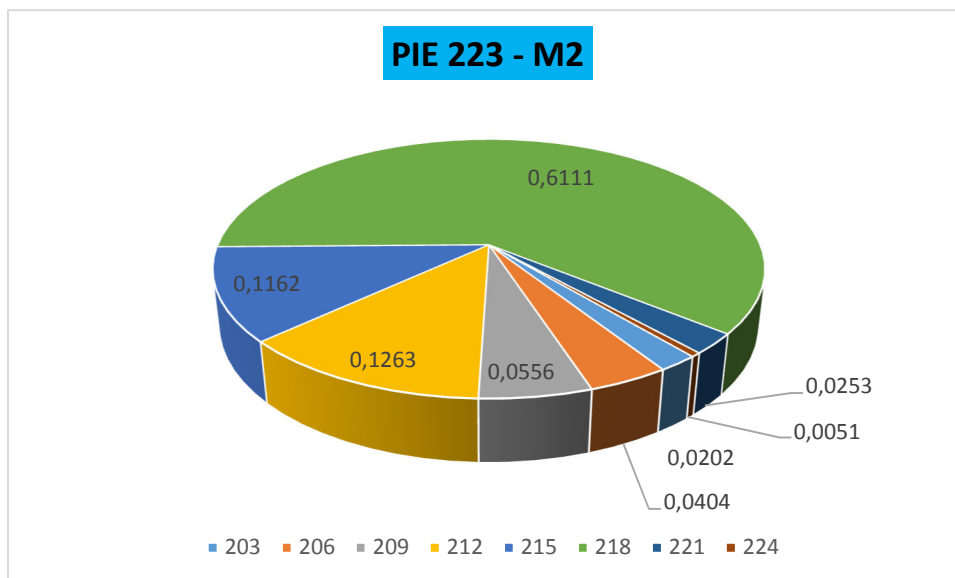
Obrázek 71 Lokus PIE 271 - M1

Lokus s názvem QrZAG7 je modře fluorescenčně naznačen a patří do multiplexu 2. Má vysokou polymorfni hodnotu díky vysokému počtu detekovaných alel 22. Alely nabývají hodnot od 116 do 158 bp.



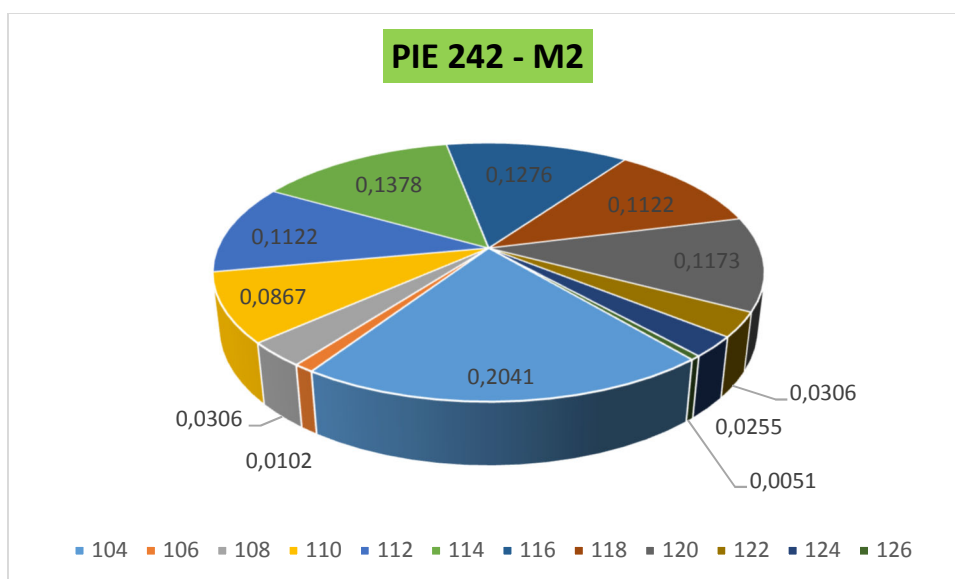
Obrázek 72 Lokus QrZAG7 – M2

Druhý modře naznačený pokus z multiplexu 2 je nazván, PIE 223. Tento lokus se skládá z 8 detekovaných alel a patří do středně polymorfni lokusů. Nejčetněji zastoupená alel s 60% je 218 bp.



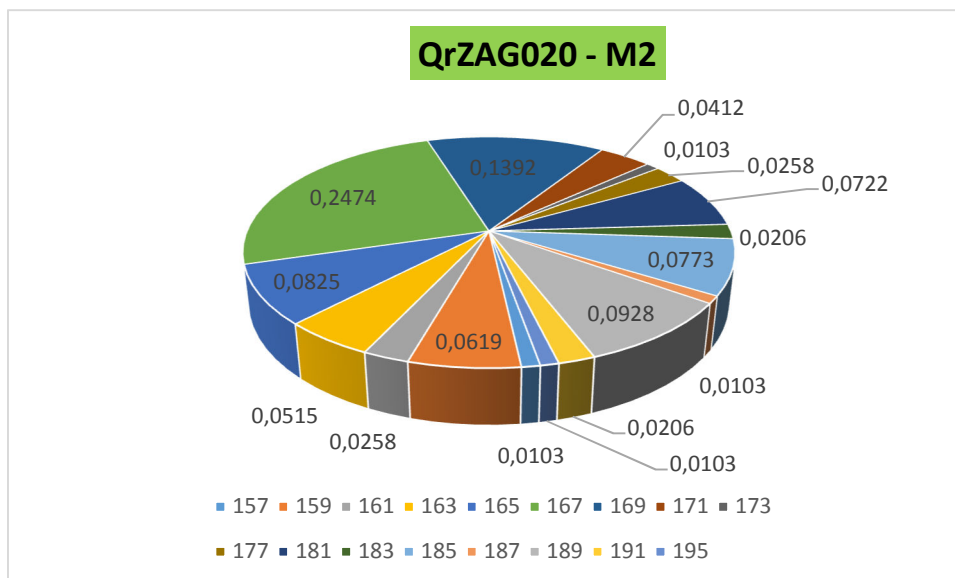
Obrázek 73 Lokus PIE 223 – M2

Lokus s názvem PIE 242 je řazen do multiplexu 2 a je zeleně naznačený. Jako středně polymorfní lokus obsahuje celkem 12 detekovaných alel. Jsou vylišovány alely v rozmezí hodnot od 104 do 126 bp.



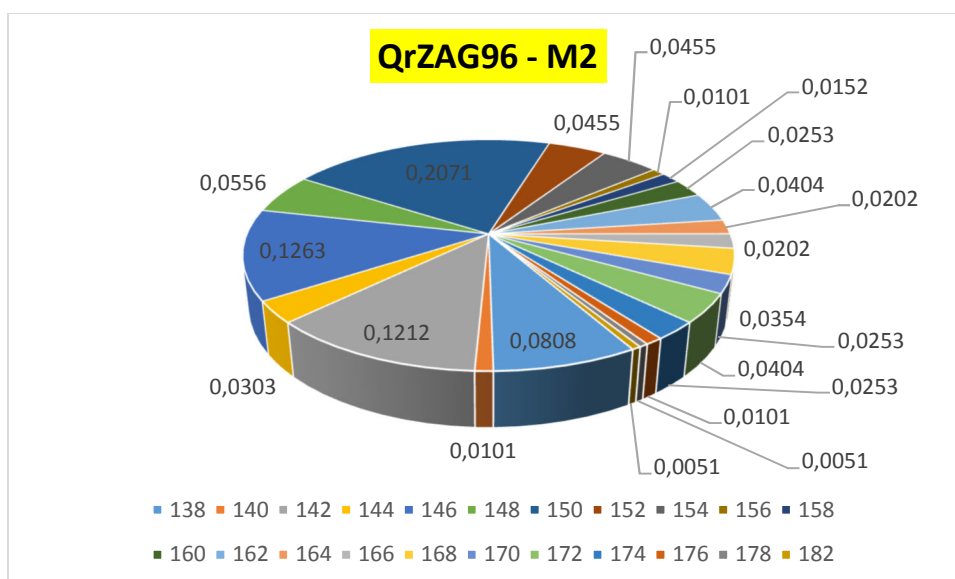
Obrázek 74 Lokus PIE 242 – M2

Poslední zeleně naznačený lokus z multiplexu 2 má název QrZAG020. Tento lokus vylišuje 17 detekovaných hodnot v rozmezí od 157 do 195 bp. Nejčetnější alel na tomto vysoce polymorfním lokusu je reprezentovaná hodnotou 11167 bp se zastoupením necelých 25%.



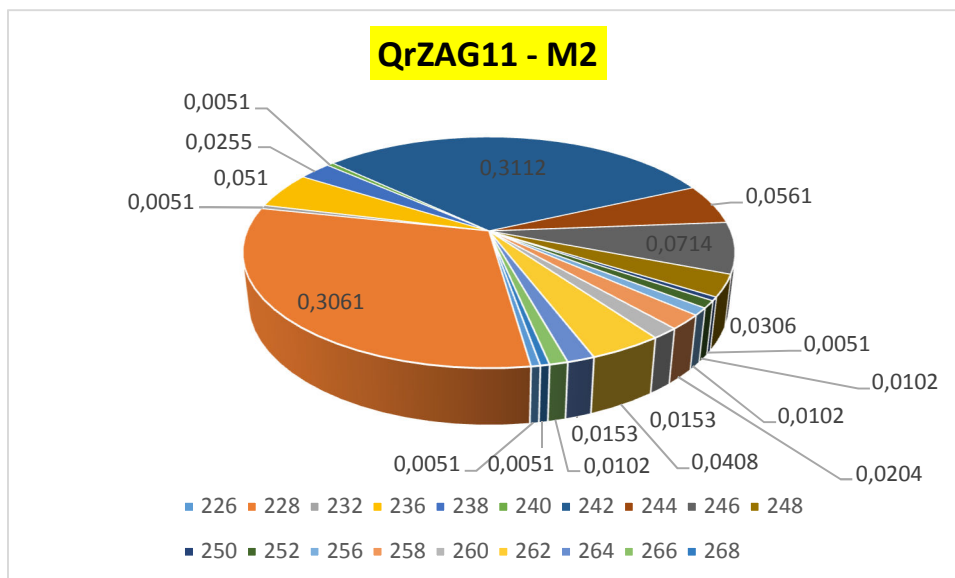
Obrázek 75 Lokus QrZAG020 – M2

Lokus s názvem QrZAG96 je žlutě fluorescenčně naznačen a patří do multiplexu 2. Jedná se o vysoce polymorfní lokus čítající 22 detekovaných alel v rozpětí sudých hodnot od 138 do 182 bp. Mezi velmi četně zastoupené alely patří 150, 146, 142 a 138 bp.



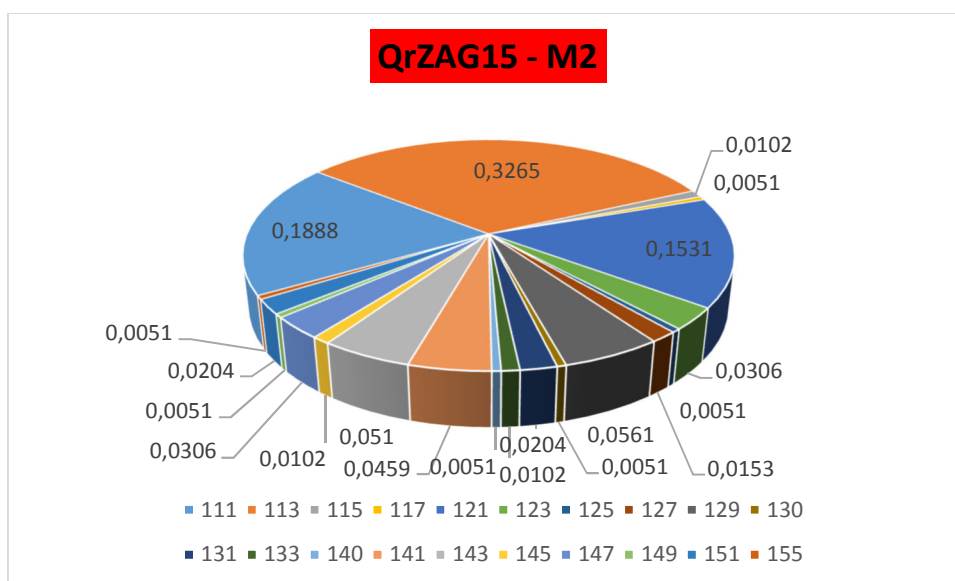
Obrázek 76 Lokus QrZAG96 – M2

Další zástupce žlutě naznačených lokusů multiplexu 2 je lokus s názvem QrZAG11. Stejně jako předchozí lokus má i tento vysokou polymorfní vypovídající hodnotu díky vysoké četnosti alel 19 kusů. Alely jsou detekovány v rozmezí hodnot od 226 do 268 bp. Nejčastěji jsou vlišovány alely 228 a 242 bp.



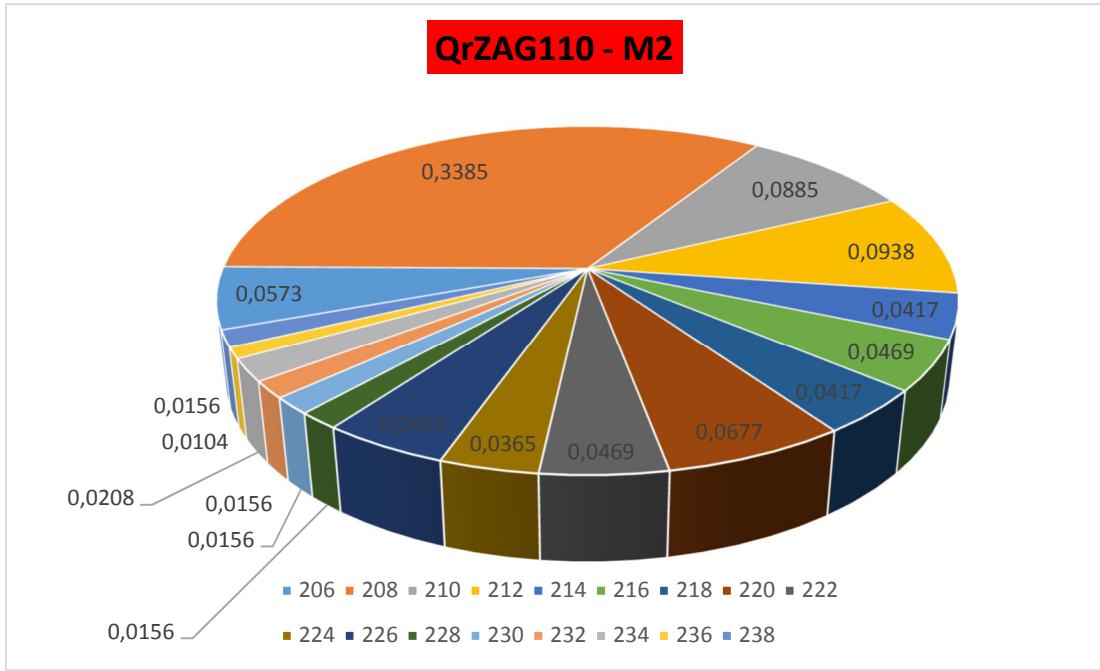
Obrázek 77 Lokus QrZAG11 – M2

Lokus s názvem QrZAG15 je červeně naznačen a nachází se v multiplexu 2 dubu zimního. Jedná se o vysoce polymorfní lokus s 20 detekovanými alelami v rozmezí hodnot 111 až 155 bp. Nejvíce je vylisována alela 113 bp. Další velmi časté alely jsou 111 a 121 bp.



Obrázek 78 Lokus QrZAG15 – M2

Poslední zástupce mikrosatelitových markerů dubu zimního je červeně naznačený lokus s názvem QrZAG110. Lokus se skládá ze 17 detekovaných lokusů. Vysoce polymorfní lokus vylisuje alely v rozmezí hodnot od 206 do 238 bp. Nejčetnější ale na tomto lokusu nabývá hodnot 208 bp.



Obrázek 79 Lokus QrZAG110 – M2

## 16.4. Jedle bělokorá

Tabulka 74 Číselné vymezení vzorků jedle bělokoré v rámci geografických lokalit

JD	PLO	LS	lokalita (číslo GZ)
1-10	21	Frýdlant	LS Frýdlant
11-20	1	Klášterec	LS Horní Blatná, Klášterec
21-30	13	Boubín	016-1 Zátoň - Kubova Huť
31-40	14	Nové Hrady	046-1 Novohradské hory
41-50	16	Jinřichův Hradec	024-2 Vojířov
51-60	41	Vsetín	200 Kychová
61-70	29	Šternberk	242 Tanečná
71-80	26	Lanškroun	122 Albrechtice
81-90	6	Stříbro	LS Stříbro
91-100	8	Nižbor	LS Nižbor

Tabulka 75 Geografické souřadnice zájmových jedinců jedle bělokoré

LS	ID	Zeměpisná šířka	Zeměpisná délka
Frýdlant	Jd1	50,8868850208818	15,0994979962706
	Jd2	50,8867889642715	15,0995069649070
	Jd3	50,8790669683367	15,1251430157572
	Jd4	50,8791229594498	15,1249909680336
	Jd5	50,9466250240802	15,2175389975309
	Jd6	50,9464340005069	15,2177890297025
	Jd7	50,9463780093938	15,2174519933760
	Jd8	50,9461439866572	15,2174150291830
	Jd9	50,9462050069123	15,2172329742461
	Jd10	50,9461800288408	15,2172710280865
Klášterec	Jd11	50,4415260069072	13,2590329740196
	Jd12	50,4414929822087	13,2591169606894
	Jd13	50,4416860174387	13,2589509990066
	Jd14	50,4417949821799	13,2586510106921
	Jd15	50,4419129993766	13,2584630046039
	Jd16	50,4417979996651	13,2582530379295
	Jd17	50,4418610315769	13,2584770023822
	Jd18	50,4420490376651	13,2586830295622
	Jd19	50,4420780390501	13,2581500243395
	Jd20	50,4460109956562	13,2365019991993
Boubín	Jd21	49,1500639915466	13,6641870159655
	Jd22	49,1502840165048	13,6642450187355
	Jd23	49,1504400037229	13,6642819829285
	Jd24	49,1505209729075	13,6644839867949
	Jd25	49,1506000142544	13,6642850004136
	Jd26	49,1508710011839	13,6647770181298
	Jd27	49,1509060375392	13,6650899983942
	Jd28	49,1510089673101	13,6659420188516
Vsetín	Jd51	49,27797502	18,17790901
	Jd52	49,27802598	18,17787004
	Jd53	49,27816504	18,17787297
	Jd54	49,27826403	18,17776501
	Jd55	49,27834298	18,17799099
	Jd56	49,27828498	18,17791597
	Jd57	49,278375	18,17796098
	Jd58	49,27836101	18,17789099
	Jd59	49,27840803	18,177749
	Jd60	49,27836402	18,17764096
Šternberk	Jd61	49,77217639	17,26141839
	Jd62	49,71572938	17,41478761
	Jd63	49,71552093	17,41457169
	Jd64	49,71504257	17,41440246
	Jd65	49,71585142	17,41323561
	Jd66	49,7155796	17,41308935
	Jd67	49,71593122	17,41313562
	Jd68	49,7159624	17,41306873
	Jd69	49,7164198	17,41303965
	Jd70	49,71646766	17,41344835
Lanškroun	Jd71	49,95579598	16,64864
	Jd72	49,95586798	16,64878098
	Jd73	49,95560101	16,64909597
	Jd74	49,95553899	16,64905398
	Jd75	49,955483	16,64939404
	Jd76	49,95563798	16,64932799
	Jd77	49,95587099	16,64942203
	Jd78	49,95573202	16,64945497

	Jd29	49,1510880086570	13,6671220231801		Jd79	49,95560302	16,64948003
	Jd30	49,1516090277582	13,6682870239019		Jd80	49,95627902	16,64842299
Nové Hradý	Jd31	48,7371789850294	14,7107620071619	Stříbro	Jd81	49,80459399	12,96382402
	Jd32	48,736669345647	14,7118132654577		Jd82	49,80474	12,96381103
	Jd33	48,7367916572839	14,7120275069028		Jd83	49,80482499	12,96373299
	Jd34	48,7363309878855	14,7122658044099		Jd84	49,80500101	12,96403902
	Jd35	48,7357294186949	14,7124932054430		Jd85	49,80524099	12,96392402
	Jd36	48,7356344517320	14,7118255030363		Jd86	49,80464201	12,96349696
	Jd37	48,7337645329535	14,7056391555815		Jd87	49,80444797	12,96338296
	Jd38	48,7334176059812	14,7054323740303		Jd88	49,80418202	12,96349403
	Jd39	48,7328413501381	14,7029125224798		Jd89	49,80418101	12,96334097
	Jd40	48,7326919008046	14,7028190642595		Jd90	49,80424597	12,96295197
Jindřichův Hradec	Jd41	49,0275029651820	14,9839739967137	Nižbor	Jd91	49,99084197	13,99130797
	Jd42	49,0275870356708	14,9841370247304		Jd92	49,99038901	13,99059702
	Jd43	49,0275830123573	14,9839460011571		Jd93	49,98903701	13,98838202
	Jd44	49,0276430267840	14,9841549620032		Jd94	49,98875102	13,98802897
	Jd45	49,0273100137710	14,9842439778149		Jd95	49,98866603	13,98847296
	Jd46	49,0273670107126	14,9842640105634		Jd96	49,98862403	13,98746403
	Jd47	49,0263109747320	14,9894639756530		Jd97	49,98852102	13,98708902
	Jd48	49,0261490363627	14,9895929731428		Jd98	49,98813604	13,98646901
	Jd49	49,0257420111447	14,9897600244730		Jd99	49,98795901	13,98793702
	Jd50	49,0260150097310	14,9898910336196		Jd100	49,98840996	13,98897504

Tabulka 76 Ukázka kvantitativních a kvalitativních parametrů izolované DNA jedle bělokoré

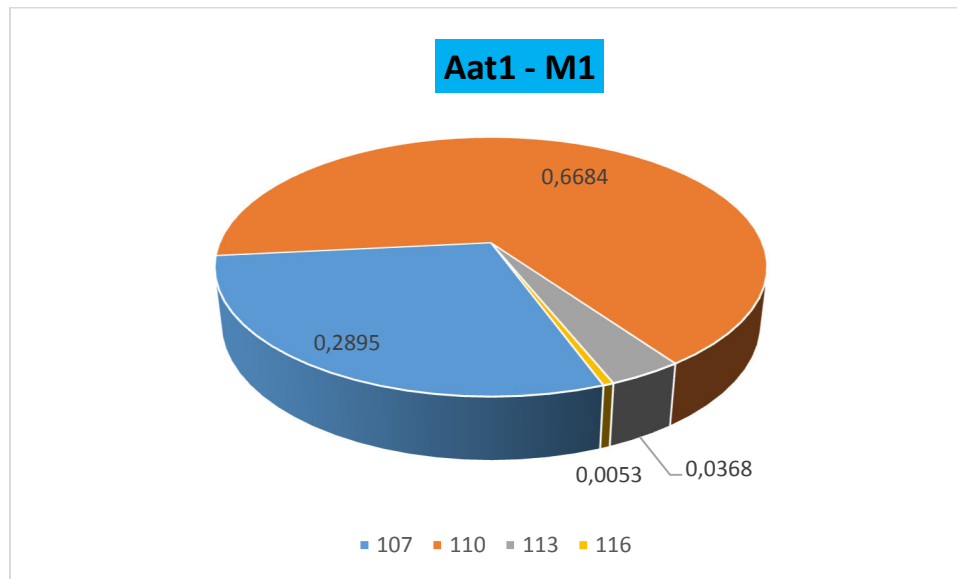
ID	C (ng/ul)	koeficient 260/280	ID	C (ng/ul)	koeficient 260/280
lcr_jd - 1	58,4	1,85	lcr_jd - 51	114,1	1,88
lcr_jd - 2	86,3	1,87	lcr_jd - 52	72,1	1,85
lcr_jd - 3	117,5	1,9	lcr_jd - 53	105,6	1,9
lcr_jd - 4	132,1	1,87	lcr_jd - 54	114,1	1,9
lcr_jd - 5	111,4	1,85	lcr_jd - 55	137,3	1,88
lcr_jd - 6	90,6	1,83	lcr_jd - 56	88,1	1,85
lcr_jd - 7	97,1	1,84	lcr_jd - 57	92	1,89
lcr_jd - 8	130,7	1,86	lcr_jd - 58	53,9	1,84
lcr_jd - 9	124,7	1,91	lcr_jd - 59	51,6	1,89
lcr_jd - 10	80,5	1,83	lcr_jd - 60	168,1	1,9
lcr_jd - 11	83,8	1,84	lcr_jd - 61	101,9	1,83
lcr_jd - 12	98,1	1,89	lcr_jd - 62	82,7	1,85
lcr_jd - 13	166,6	1,87	lcr_jd - 63	87	1,87
lcr_jd - 14	149	1,88	lcr_jd - 64	93,9	1,85
lcr_jd - 15	96,9	1,84	lcr_jd - 65	98,3	1,85
lcr_jd - 16	98,7	1,87	lcr_jd - 66	94,3	1,85
lcr_jd - 17	89,3	1,89	lcr_jd - 67	186,4	1,87



lcr_jd - 18	99,6	1,87	lcr_jd - 68	128,2	1,86
lcr_jd - 19	60,4	1,86	lcr_jd - 69	87,7	1,79
lcr_jd - 20	108,3	1,81	lcr_jd - 70	149,7	1,87
lcr_jd - 21	191,6	1,89	lcr_jd - 71	265,6	1,87
lcr_jd - 22	122,8	1,89	lcr_jd - 72	83,3	1,86
lcr_jd - 23	149,9	1,87	lcr_jd - 73	120,6	1,91
lcr_jd - 24	109,9	1,86	lcr_jd - 74	85,8	1,86
lcr_jd - 25	99	1,89	lcr_jd - 75	59,9	1,9
lcr_jd - 26	117,4	1,89	lcr_jd - 76	106,4	1,89
lcr_jd - 27	72,4	1,86	lcr_jd - 77	125,4	1,91
lcr_jd - 28	108,9	1,93	lcr_jd - 78	73,2	1,84
lcr_jd - 29	16,6	1,78	lcr_jd - 79	91,8	1,91
lcr_jd - 30	49,6	1,87	lcr_jd - 80	141,6	1,9
lcr_jd - 31	63,3	1,86	lcr_jd - 81	64,6	1,89
lcr_jd - 32	64,8	1,89	lcr_jd - 82	62,8	1,87
lcr_jd - 33	124,2	1,88	lcr_jd - 83	88,4	1,85
lcr_jd - 34	94,4	1,87	lcr_jd - 84	88,6	1,88
lcr_jd - 35	69,5	1,86	lcr_jd - 85	7,8	1,56
lcr_jd - 36	104,8	1,87	lcr_jd - 86	40,3	1,82
lcr_jd - 37	60,5	1,81	lcr_jd - 87	92,8	1,87
lcr_jd - 38	65,4	1,87	lcr_jd - 88	53,8	1,8
lcr_jd - 39	63,4	1,82	lcr_jd - 89	64,6	1,81
lcr_jd - 40	93,2	1,89	lcr_jd - 90	40,9	1,81
lcr_jd - 41	79,8	1,87	lcr_jd - 91	87,4	1,85
lcr_jd - 42	239,5	2,11	lcr_jd - 92	76,7	1,82
lcr_jd - 43	81,4	1,81	lcr_jd - 93	36,9	1,77
lcr_jd - 44	57,8	1,78	lcr_jd - 94	69,7	18,3
lcr_jd - 45	84,9	1,87	lcr_jd - 95	50,9	17,7
lcr_jd - 46	83,9	1,88	lcr_jd - 96	63	1,8
lcr_jd - 47	95,6	1,84	lcr_jd - 97	56	1,77
lcr_jd - 48	78,9	1,85	lcr_jd - 98	44,6	1,71
lcr_jd - 49	109,8	1,9	lcr_jd - 99	44,7	1,72
lcr_jd - 50	89,1	1,88	lcr_jd - 100	51,3	1,71

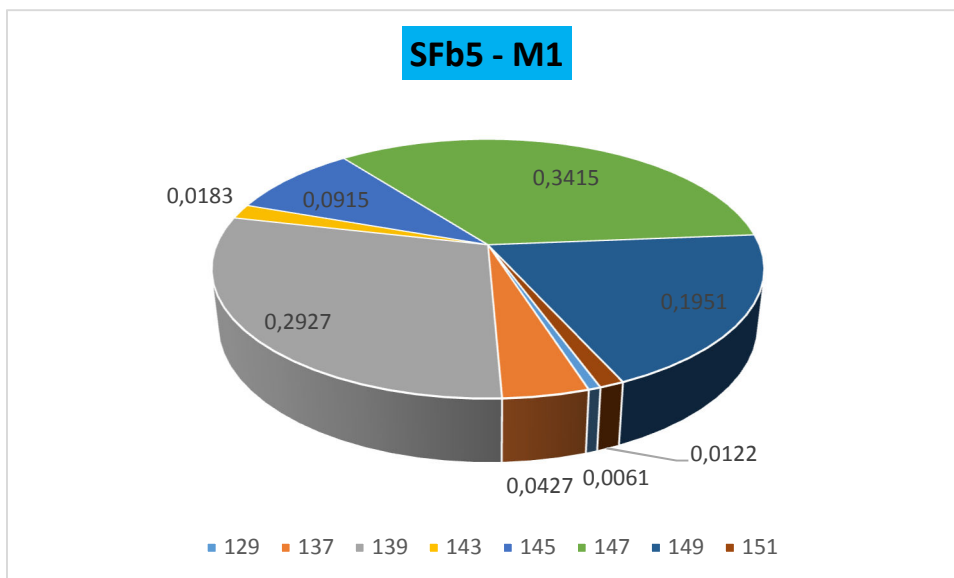
### 16.4.1. Charakteristika jednotlivých mikrosatelitových lokusů jedle bělokoré

První pozorovaný lokus Aat1 obsahuje alely, které se vyskytují od hodnot 107 po 116 bp. Tento lokus je naznačen modrou fluorescenční barvou. Dominantní zastoupení v tomto lokusu zastává alela na délce 110, v závěsu potom co do četnosti se vyskytuje alela 107. Tento lokus se řadí mezi mírně polymorfní lokusy a celkově obsahuje 4 pozice alel, které byly na vzorcích detekovány.



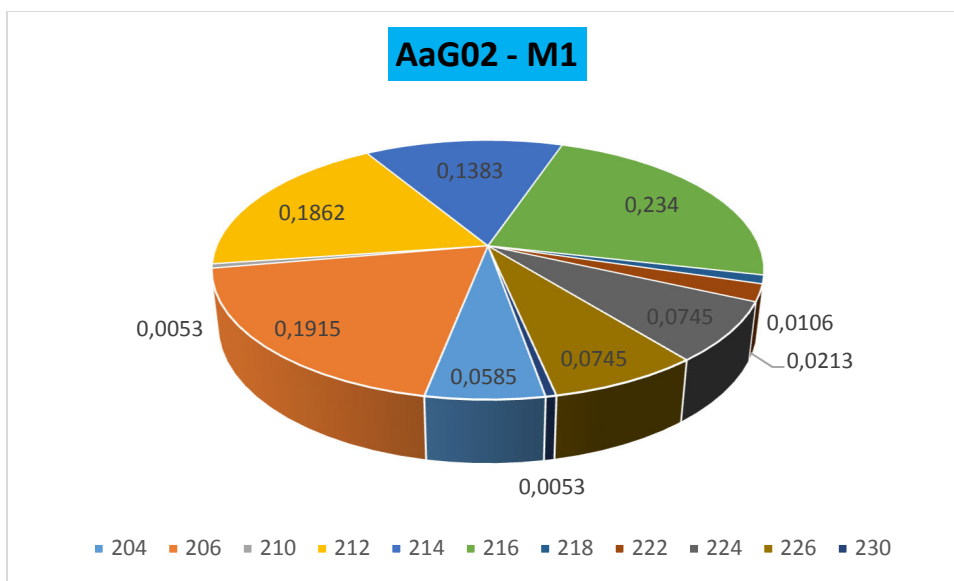
Obrázek 80 Lokus Aat1 - M1

Modře naznačený mikrosatelitní marker s názvem Sfb5 patří do multiplexu 1. V tomto lokusu se nachází 8 alel v rozmezí hodnot od 129 do 151 bp. Nejvíce zastoupená je alela 147 bp.



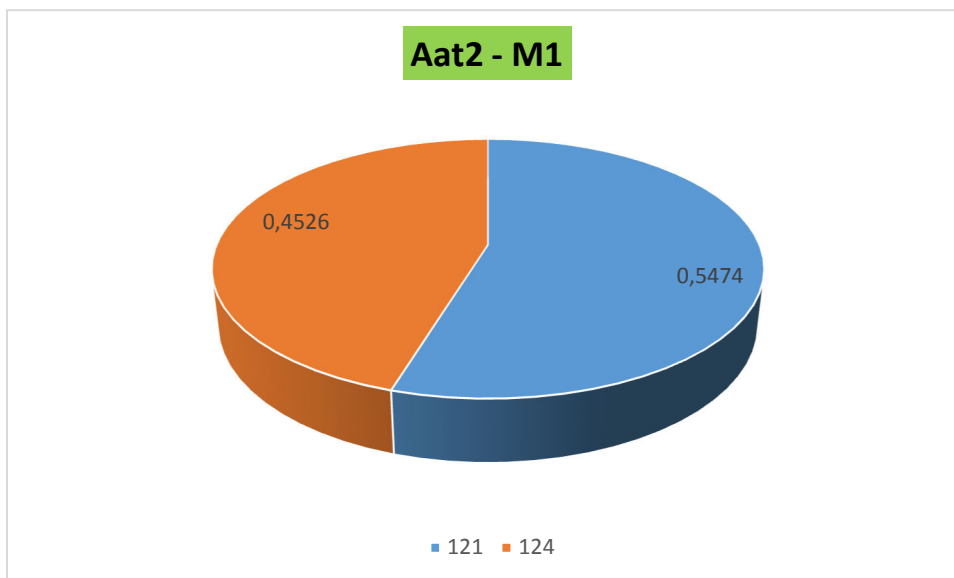
Obrázek 81 Lokus SFb5 - M1

Lokus s názvem AaG02 je poslední z trojice modře naznačených markerů multiplexu 1. Lokus obsahuje 11 detekovaných alel v rozmezí hodnot 204 až 230 bp, které nabývají sudých hodnot. Mezi nejčetnější alely patří alely s hodnotami 216, 206, 212 a 214 bp.



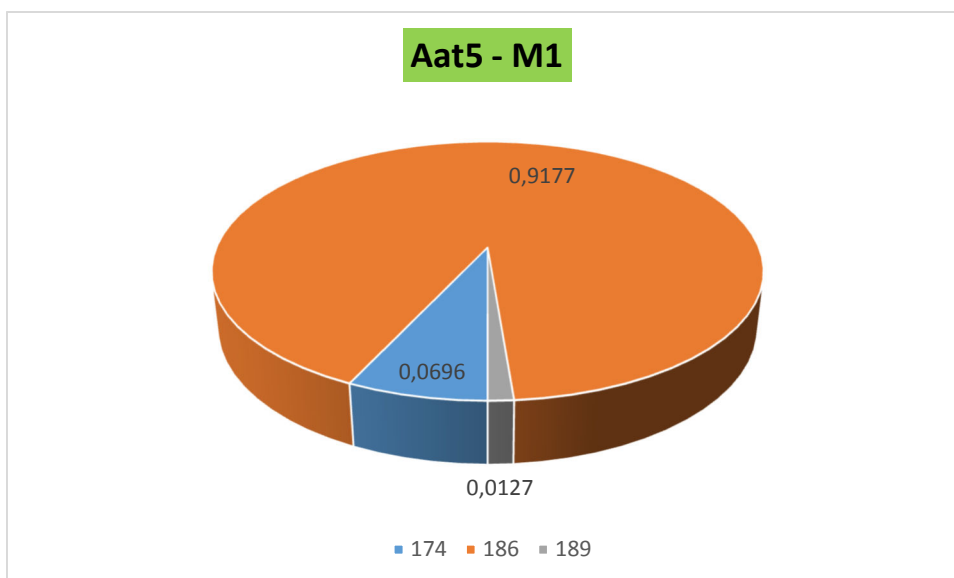
Obrázek 82 Lokus AaG02 - M1

Lokus s názvem Aat2 je zeleně fluorescenčně značený a patří do multiplexu 1. Skládá se pouze ze dvou alel s hodnotami 121 a 124. I když je tento lokus velmi málo polymorfní pro celkový dokres a přesnost identifikace vnitropopulační struktury je velmi užitečný.



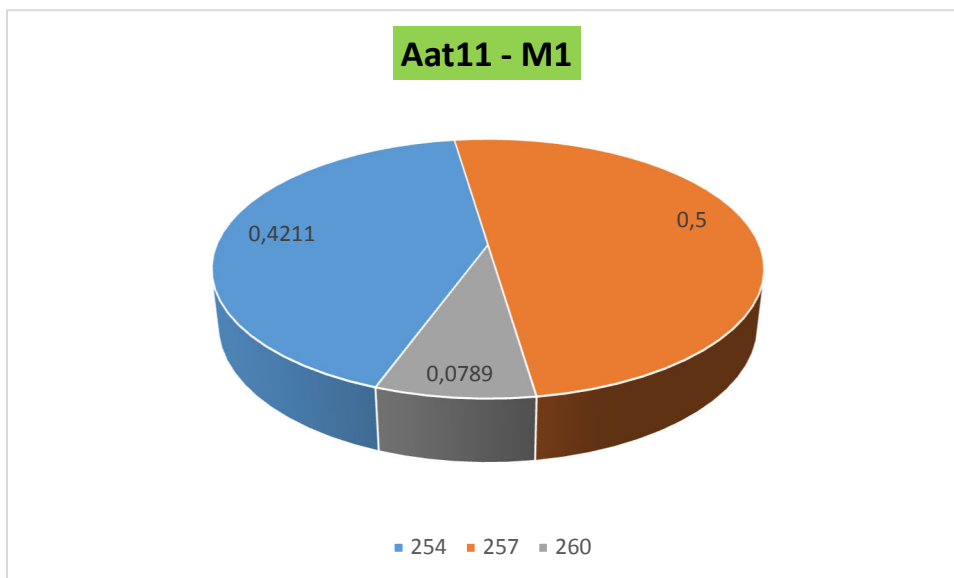
Obrázek 83 Lokus Aat2 - M1

Další lokus s malou variabilitou alel je zeleně naznačený mikrosatelitový marker Aat5 patří do multiplexu 1. Tento lokus vylučuje 3 alely v hodnotách 174, 186 a 189. Nejčetnější alelou pro tento lokus je alel s hodnotou 186 bp.



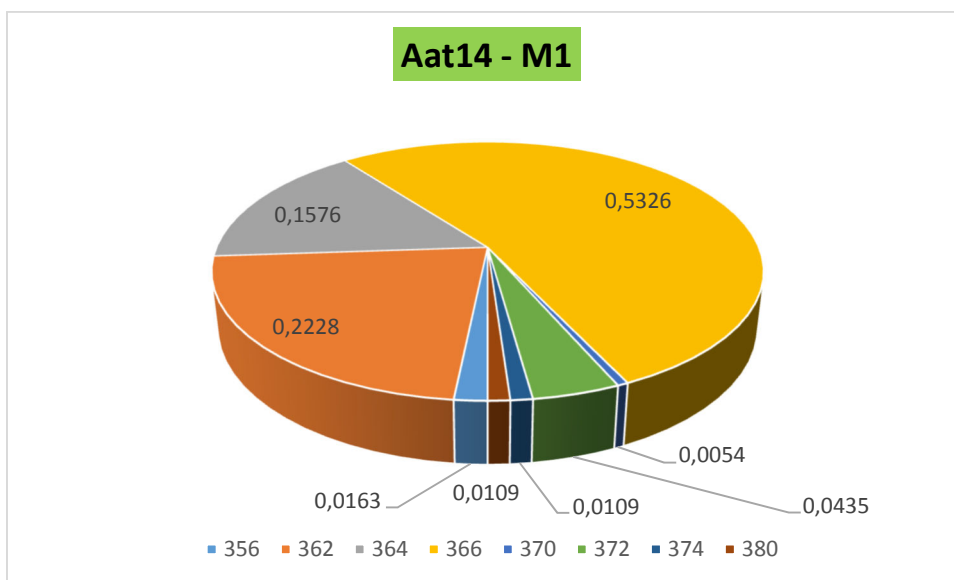
Obrázek 84 Lokus Aat5 - M1

Dalším zástupcem zeleně naznačeného lokusu je mikrosatelitový marker s označením Aat11. Lokus se skládá ze 3 detekovaných alel. Alely dosahují hodnot 254, 257 a 260. Největší četnost čítá alel 257 bp.



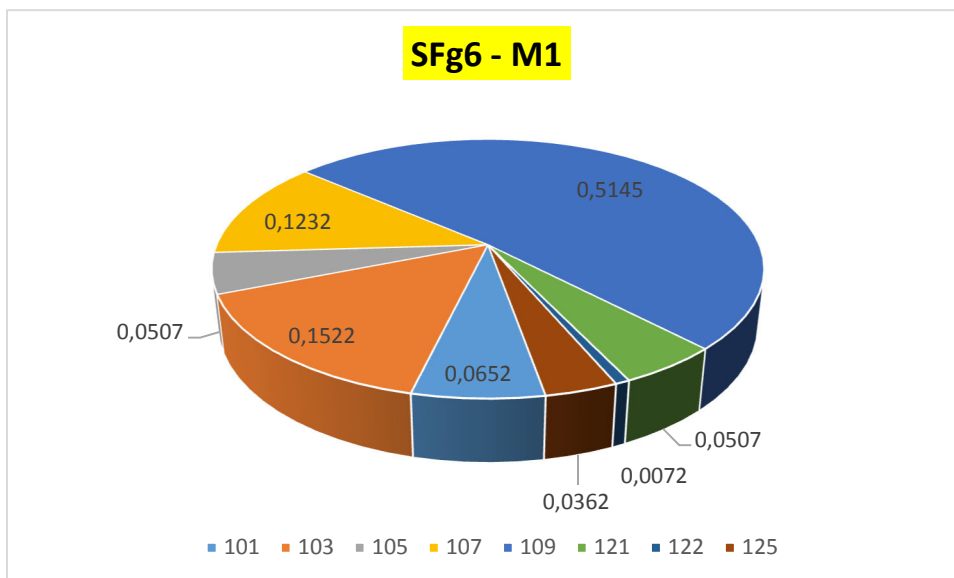
Obrázek 85 Lokus Aat11 - M1

Poslední ze zeleně naznačených markerů multiplexu 1 je lokus s názvem Aat14. Tento středně polymorfní lokus obsahuje 8 alel. Alely dosahují hodnot od 356 do 380 bp. Nejzastoupenější alel tohoto lokusu je alela s hodnotou 366. Další velmi častě zastoupené jsou alely 362 a 364 bp.



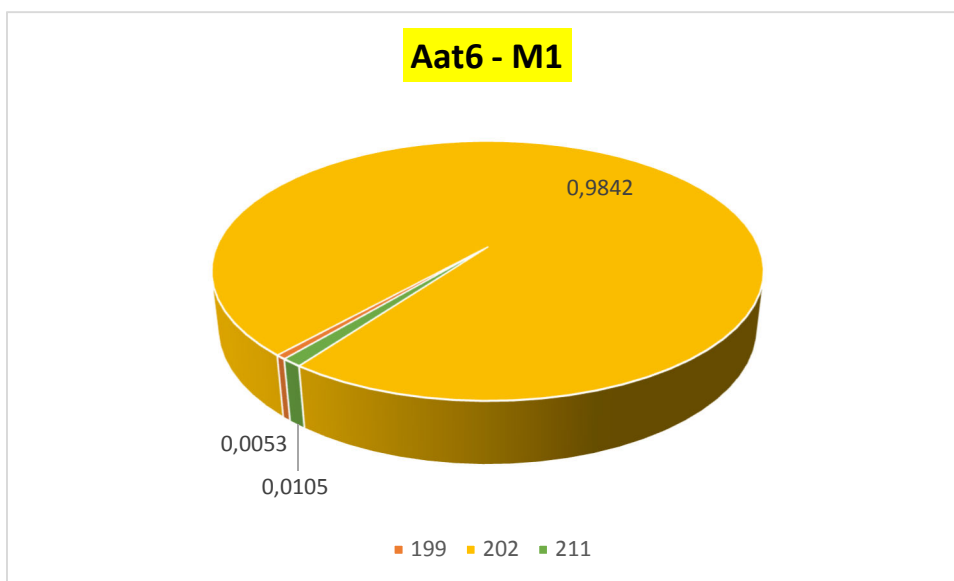
Obrázek 86 Lokus Aat14 - M1

Lokus s názvem SFg6 je žlutě fluorescenčně naznačený a je zařazen do multiplexu 1. Středně polymorfní lokus obsahuje 8 detekovaných alel. Alely se vylíší v rozmezí hodnot od 101 do 125 bp. Nejčastěji detekovaná alela má hodnotu 109 bp a je vylíšovaná ve více jak 50%.



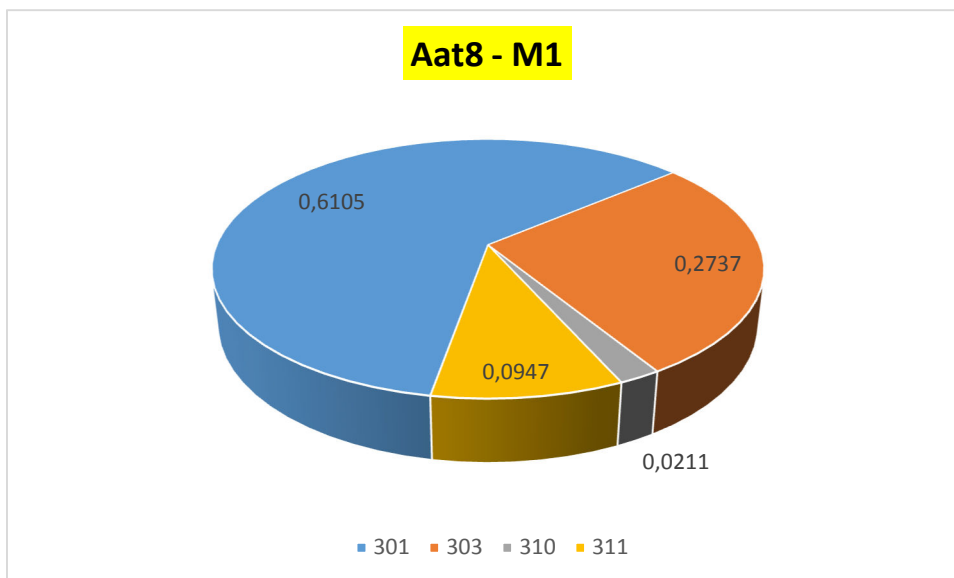
Obrázek 87 Lokus SFg6 - M1

Žlutě naznačený mikrosatelitový marker z multiplexu 1 má název Aat6. Jedná se o málo polymorfní lokus obsahující 3 alely. Alely dosahují hodnot 199, 202 a 211. Dominantní alela 202 má četnost více jak 90%.



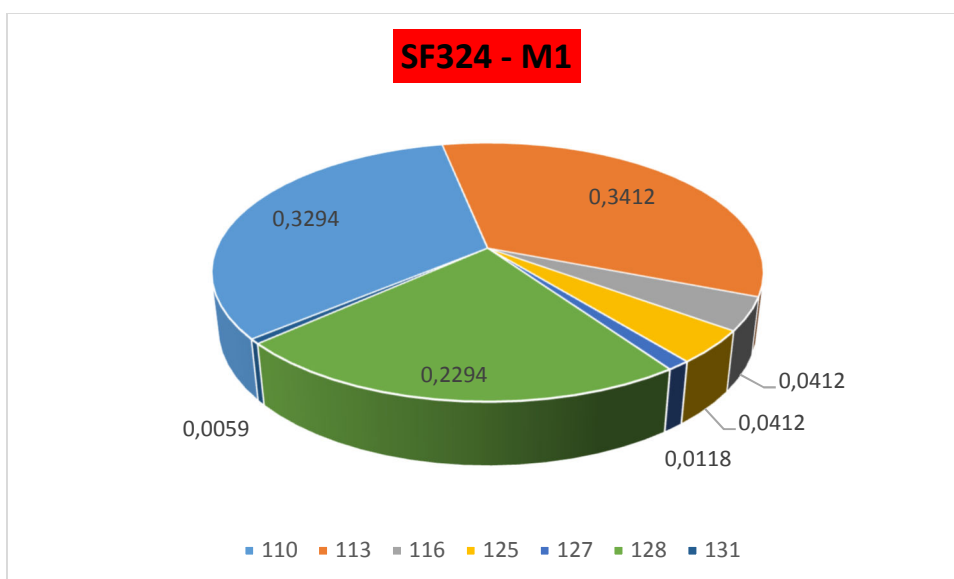
Obrázek 88 Lokus Aat6 - M1

Další žlutě naznačený mikrosatelitový marker Aat8 je žlutě fluorescenčně naznačen a je součástí multiplexu 1. Patří do kategorie mírně polymorfních lokusů, který se skládá ze 4 detekovaných alel. Tento lokus vylíčuje alely v rozmezí hodnot od 301 do 311 bp. Nejčetnější alel má hodnotu 301 bp.



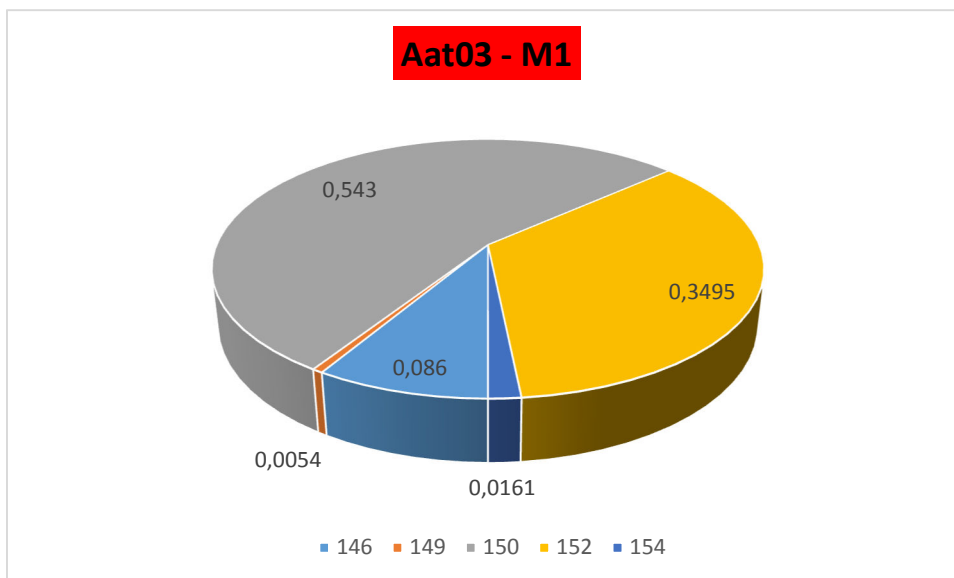
Obrázek 89 Lokus Aat8 - M1

Lokus s názvem SF324 je červeně naznačen a součástí multiplexu 1. Tento lokus je středně polymorfní a obsahuje celkem 7 alel. Alely se nacházejí v rozpětí hodnot od 110 do 131 bp. Nejvíce zastoupené jsou alely 110, 113 a 128 bp.



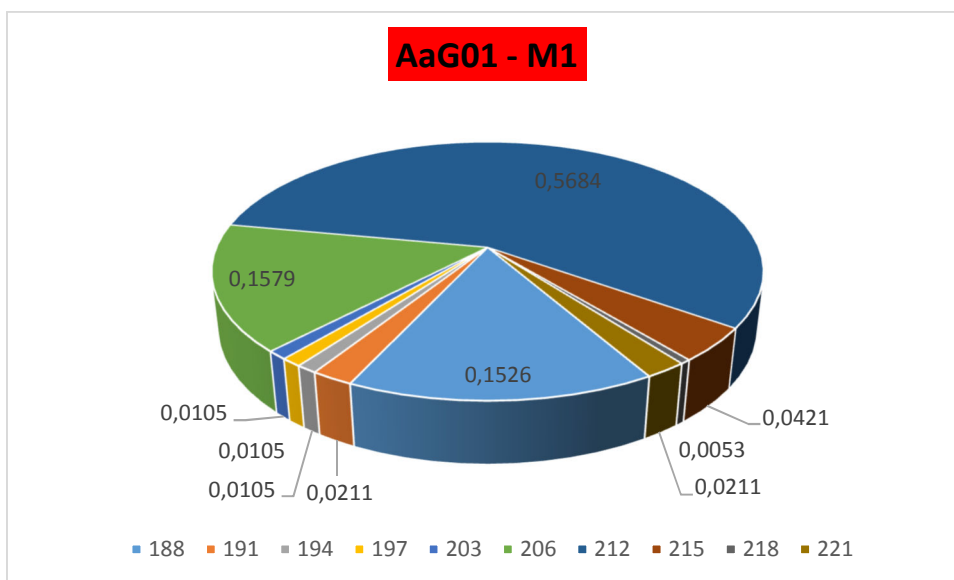
Obrázek 90 Lokus SF324 - M1

Červeně naznačený lokus s označení Aat03 je také součástí multiplexu 1. Tento středně polymorfní lokus obsahuje celkem 5 detekovaných alel v rozpětí hodnot 146 až 154 bp. Mezi nejvíce detekované alely se řadí alely 150 a 152 bp.



Obrázek 91 Lokus Aat03 - M1

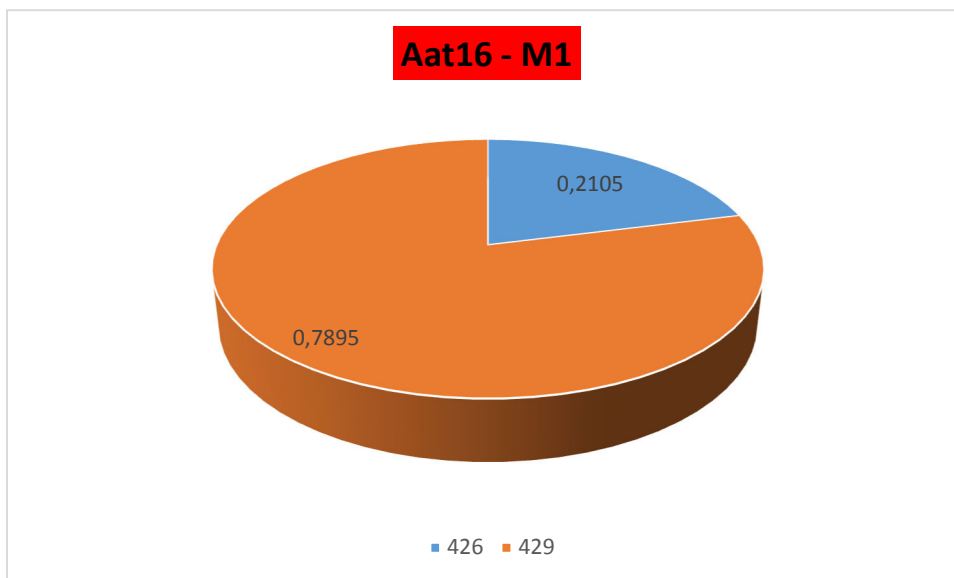
Lokus s názvem AaG01 je naznačen červeně fluorescenční barvou a je součástí multiplexu 1. Obsahuje alely v rozmezí hodnot od 188 do 221 bp. Díky počtu 10 detekovaných alel řadíme tento lokus mezi středně polymorfní. Nejvíce zastoupená alela na tomto lokusu je alela 212 bp.



Obrázek 92 Lokus AaG01 - M1

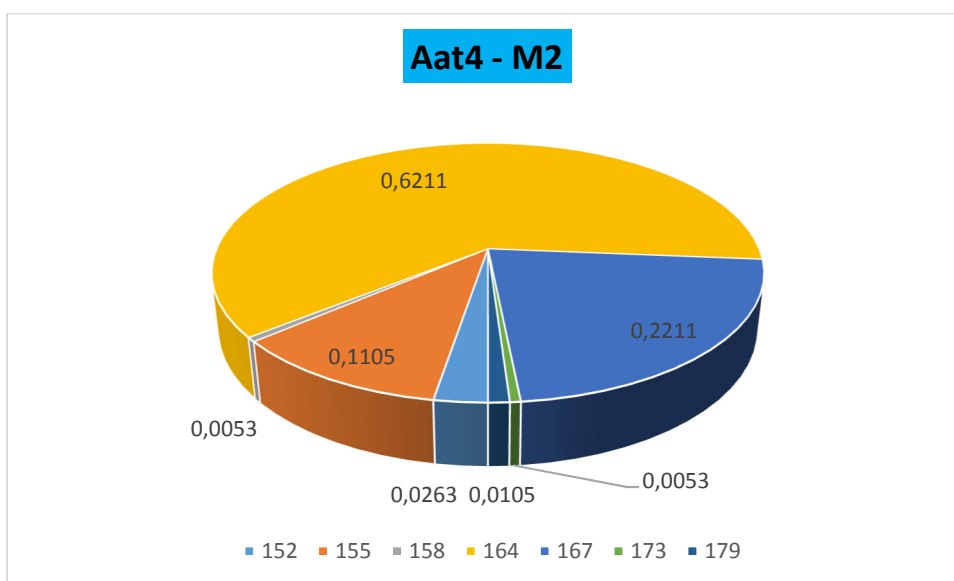
Poslední zástupce multiplexu 1 je lokus s označením Aat16, který je naznačen červeně. Obsahuje dvě alely s hodnotami 426 a 429 bp. Tento lokus ač je málo polymorfní je užitečný nástroj k identifikaci rodičovského stromu či haplotypové linie.





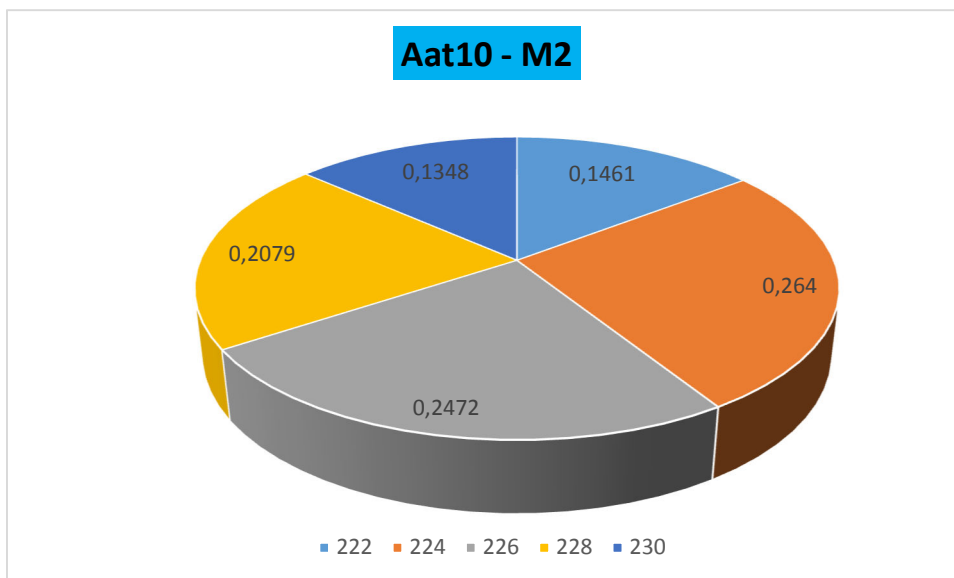
Obrázek 93 Lokus Aat16- M1

Lokus s názvem Aat4 je prvním zástupcem multiplexu 2 a je modře fluorescenčně naznačen. Středně polymorfní lokus čítá celkem 7 alel. Alely se nachází v rozpětí od 152 do 179 bp. Nejčetnější alela čítá 164 bp a další velmi četné alely jsou 167 a 155 bp.



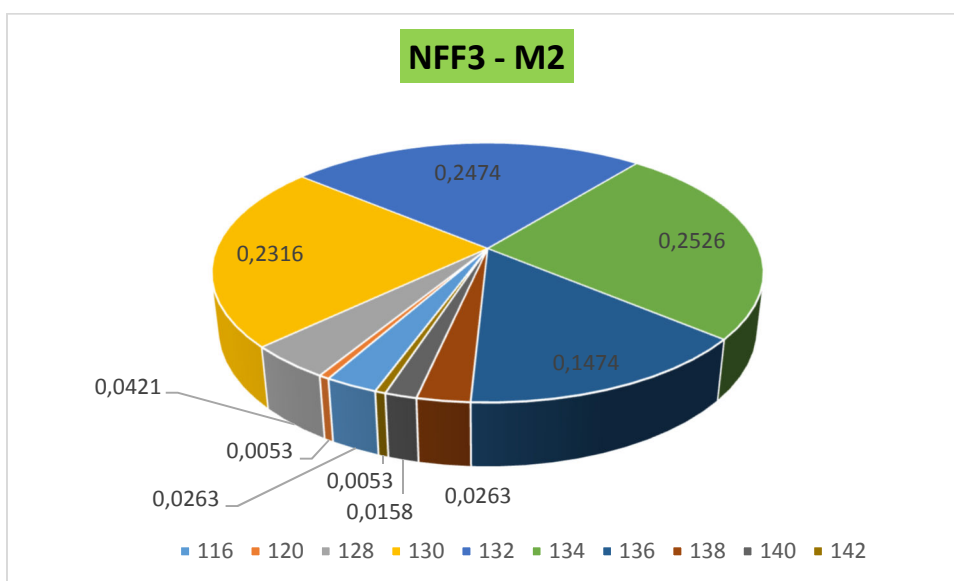
Obrázek 94 Lokus Aat4- M2

Další modře naznačený lokus s názvem Aat10 patří do multiplexu 2. Obsahuje 5 detekovaných alel na sudých pozicích. S tímto počtem alel řadíme lokus mezi středně polymorfní lokusy. Nejčetnější alela nabývá hodnot 226 bp.



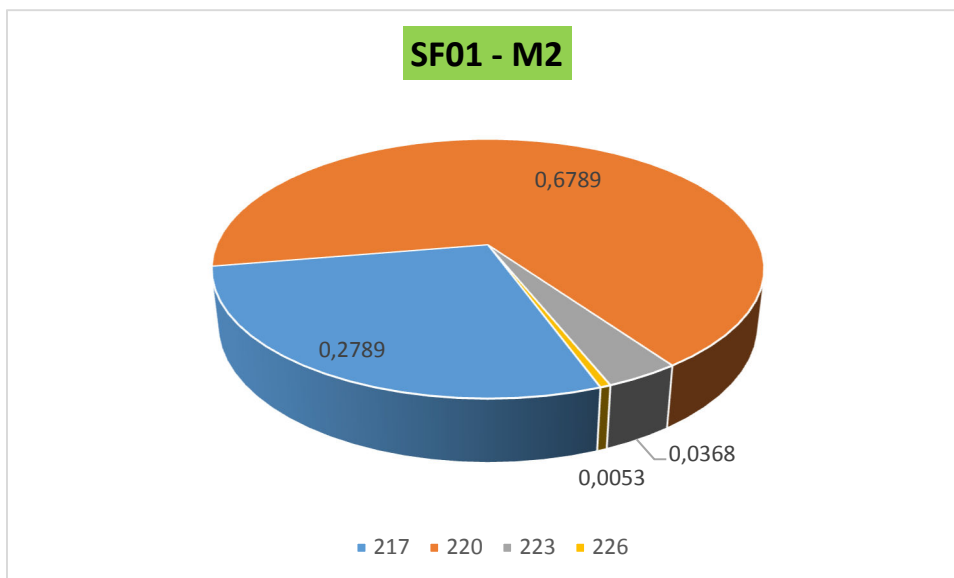
Obrázek 95 Lokus Aat10 – M2

Lokus pod názvem NFF3 je naznačen zeleně fluorescenční barvou a patří do multiplexu 2. Tento lokus se nachází v rozpětí hodnot od 116 do 142 bp. Celkem je na tomto středně polymorfním lokusu detekováno 10 alel. Mezi nejčastěji vylišované alely patří 134, 132, 130 a 136 bp.



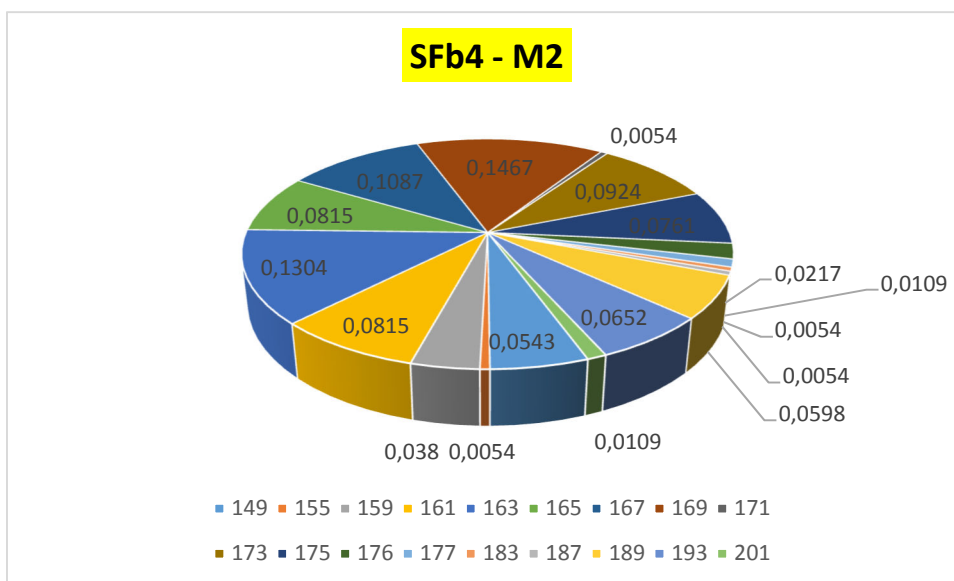
Obrázek 96 Lokus NFF3 – M2

Druhý se zástupců loků zeleně naznačených lokusů je mikrosatelitový marker SF01 patřící do multiplexu 2. Obsahuje 4 detekované alely o hodnotách 217, 220, 223, 226 bp. Alely 220 a 217 jsou zastoupeny nejčastěji.



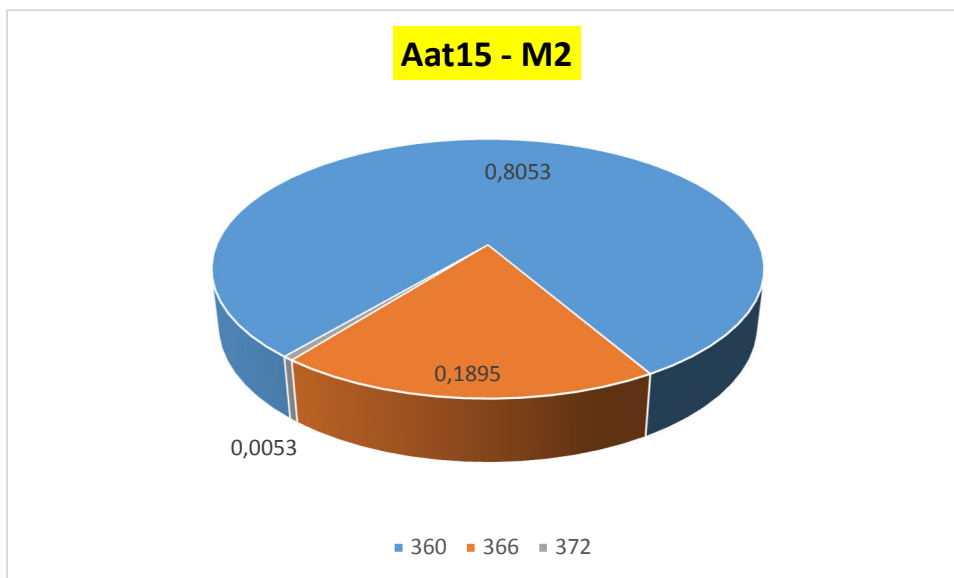
Obrázek 97 Locus NFF3 – M2

Lokus s názvem SFb4 je žlutě fluorescenčně naznačený a je součástí multiplexu 2. Počet 18 detekovaných alel značí vysokou míru polymorfismu u tohoto lokusu. Alely se vylíší v rozmezí hodnot od 149 do 201 bp. Nejčastější alela 169 bp se vyskytuje v 14% zastoupení.



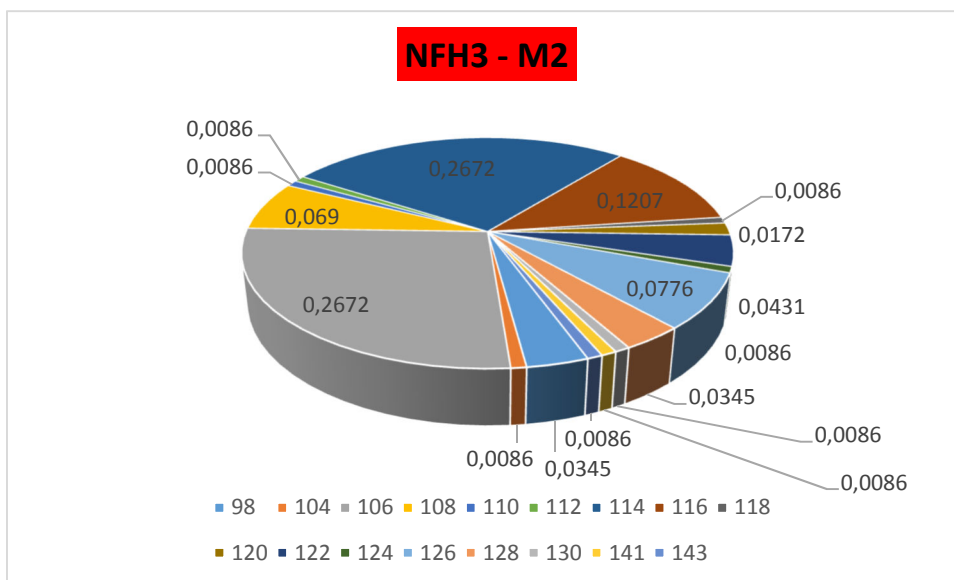
Obrázek 98 Locus NFF3 – M2

Další žlutě naznačený lokus se nazývá Aat15 a je součástí multiplexu 2. Tento mírně polymorfní lokus obsahuje 3 detekované alely, 360, 366 a 372 bp. Alela 360 bp se vyskytuje nejčastěji.



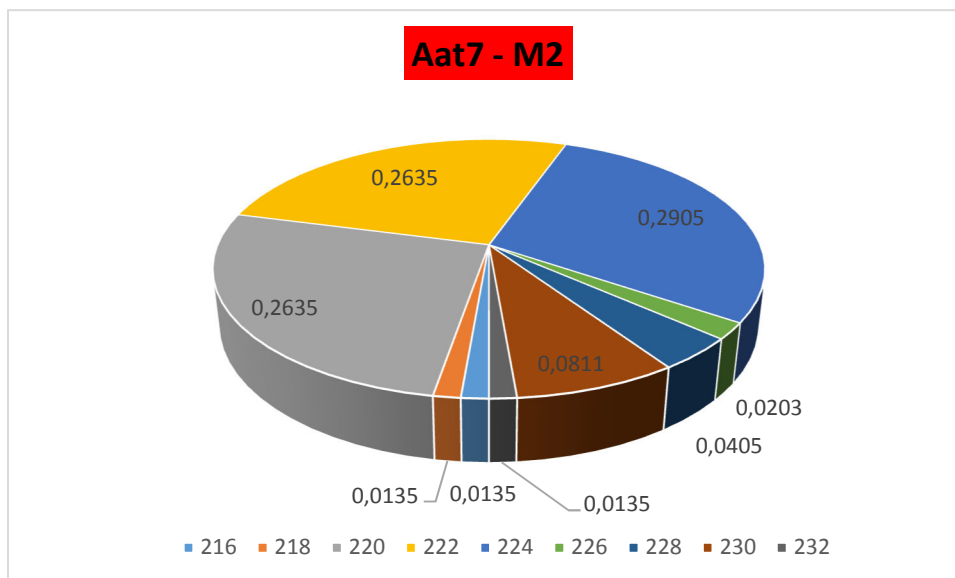
Obrázek 99 Lokus Aat15 – M2

První červeně označený lokus multiplexu 2 má název NFH3. Jeho rozšíření je mapováno od hodnot 98 po 143 bp. Lokus má vysokou míru polymorfismu, obsahuje dohromady 17 pozic alel. Nejčastěji zastoupené jsou alely o hodnotě 106 a 114 bp.



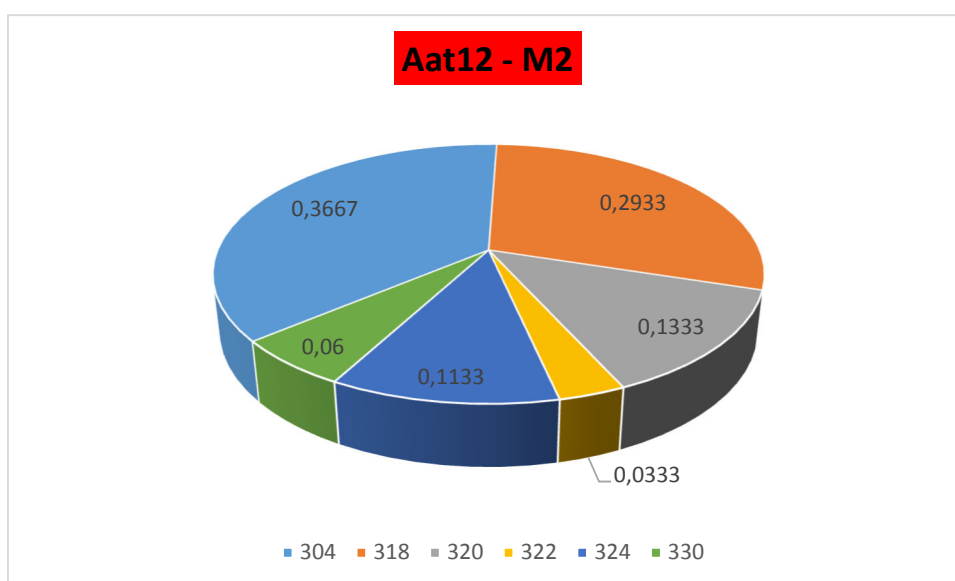
Obrázek 100 Lokus NFH3 – M2

Další červeně označený lokus s názvem Aat7 patří do multiplex 2. Středně polymorfní lokus obsahuje 9 pozic detekovaných alel. Alely se vylíší v rozmezí hodnot od 216 do 232 bp. Nejvíce zastoupené jsou alely 224, 222 a 220 bp.



Obrázek 101 Lokus Aat7 – M2

Poslední mikrosatelitový marker, který je součástí multiplexu 2 je lokus Aat12. Lokus je červeně označen a řadí se mezi středně polymorfní lokusy. Obsahuje celkem 6 detekovaných alel v rozmezí hodnot od 304 do 330 bp. Nejvíce je zastoupena alela na pozici 304 bp.



Obrázek 102 Lokus Aat12 – M2

## 16.5. Smrk ztepilý

Tabulka 77 Číselné vymezení vzorků smrku ztepilého v rámci geografických lokalit

SM	PLO	LS	lokalita (číslo GZ)
1-10	21	Frýdlant	85-1 Jindřichovické smrčiny
11-20	11	Přimda	LS Přimda
21-30	1	Litvínov	LS Litvínov - krušnohorský
31-40	13	Boubín	016-1 Zátoň- Kubova Huť
41-50	14	Nové Hrady	046-1 Novohradské hory
51-70	16	Pelhřimov	37 Černovice
71-80	27	Jeseník	164 Rejvíz
81-90	40	Frýdek-Místek	182 Lysá Hora
91-100	30	Prostějov	LS Prostějov - chlumní
101-110	165	Rychnov	LS Rychnov

Tabulka 78 Geografické souřadnice zájmových jedinců smrku ztepilého

LS	ID	latitude	longitude	LS	ID	latitude	longitude
Frýdlant	Sm1	50,9407680016010	15,2303010318428	Jeseník	Sm71	50,2191410399973	17,3145070206373
	Sm2	50,9413379710167	15,2304570190608		Sm72	50,2196130249649	17,3144360259175
	Sm3	50,9417829662561	15,2302649896591		Sm73	50,2196079958230	17,3154110088944
	Sm4	50,9418429806828	15,2296080160886		Sm74	50,2201900351792	17,3160920385271
	Sm5	50,9419940225780	15,2284339629113		Sm75	50,2184819709509	17,3145940247923
	Sm6	50,9397240355610	15,2367450390011		Sm76	50,2184249740093	17,3141389712691
	Sm7	50,9401629958301	15,2369750384241		Sm77	50,2190569695085	17,3139789607375
	Sm8	50,9407390002161	15,2369000203907		Sm78	50,2202760335057	17,3131889663636
	Sm9	50,9416060242801	15,2361299749463		Sm79	50,2207539696246	17,3124510236084
	Sm10	50,9424019698053	15,2359620016068		Sm80	50,2214479912072	17,3124520294368
Přimda	Sm11	49,7151500266045	12,4953680019825	Frýdek - Místek	Sm81	49,5489359647035	18,4546289965510
	Sm12	49,7146549914032	12,4950290378183		Sm82	49,5487320329993	18,4544140007346
	Sm13	49,7143600322306	12,4950499925762		Sm83	49,5486519858241	18,4542199596762
	Sm14	49,7142020333558	12,4953069817274		Sm84	49,5486329589039	18,4542600251734
	Sm15	49,7139459662139	12,4955300241708		Sm85	49,5483590383082	18,4545549843460
	Sm16	49,7139970120042	12,4950820114463		Sm86	49,5482520014047	18,4547910187393
	Sm17	49,7141659911721	12,4945609923452		Sm87	49,5481390133500	18,4551680367439
	Sm18	49,7140130214393	12,4939350318163		Sm88	49,5479850377887	18,4550559706985
	Sm19	49,7142740339040	12,4938160087913		Sm89	49,5477840397506	18,4550849720835
	Sm20	49,7145359683781	12,4943330045789		Sm90	49,5482810027897	18,4558039717376
Litvínov	Sm21	50,5938759818673	13,3389239944517	Prostějov	Sm91	49,5853809826076	16,7793739680200
	Sm22	50,5941260140389	13,3384230080991		Sm92	49,5853659790009	16,7796199768781
	Sm23	50,5943499784916	13,3378699701279		Sm93	49,5855150092393	16,7800779640674
	Sm24	50,5950920283794	13,3370310254395		Sm94	49,5853249914944	16,7801720090210
	Sm25	50,5953249614685	13,3363169711083		Sm95	49,5850099995732	16,7805460095405
	Sm26	50,5960950069129	13,3367000240832		Sm96	49,5914609637111	16,7751789931207

	Sm27	50,5967639666050	13,3367740362882		Sm97	49,5915669947862	16,7750380095094
	Sm28	50,5975230317562	13,3368830010294		Sm98	49,5915059745311	16,7746780067682
	Sm29	50,5981879681348	13,3367020357400		Sm99	49,5911940000951	16,7749800067394
	Sm30	50,5980390217155	13,3374870009720		Sm100	49,5909660123288	16,7744790203869
Boubín	Sm31	49,1505339648574	13,6644880101084	Rychnov	Sm101	50,2011649589985	16,5191029664129
	Sm32	49,1511389706283	13,6640929710119		Sm102	50,2011529728770	16,5194489713758
	Sm33	49,1508849989622	13,6652159783989		Sm103	50,2012369595468	16,5198639594018
	Sm34	49,1509760264307	13,6662140116095		Sm104	50,2014539670199	16,5206329990178
	Sm35	49,1514889989048	13,6674419604241		Sm105	50,2014549728482	16,5210749767720
	Sm36	49,1515480075031	13,6681270133703		Sm106	50,2016610000282	16,5209879726171
	Sm37	49,1516179963946	13,6690750066190		Sm107	50,2017380297183	16,5206429734826
	Sm38	49,1519579663872	13,6692579835653		Sm108	50,2020919974893	16,5203460026532
	Sm39	49,1521889716386	13,6690699774771		Sm109	50,2016360219568	16,5201809629797
	Sm40	49,1524410154670	13,6694599874317		Sm110	50,2017490100115	16,5196659788489
Nové	Sm41	49,7954172268509	14,6727173030376				
Hrady	Sm42	48,7368457205593	14,7120012715458				
	Sm43	48,7356807198375	14,7123821452260				
	Sm44	48,7355018500238	14,7119207214564				
	Sm45	48,7353500537574	14,7117478027939				
	Sm46	48,7119187787175	14,6943265199661				
	Sm47	48,7116155214607	14,6948514785617				
	Sm48	48,7113753799349	14,6953849866986				
	Sm49	48,7114757951349	14,6961693651974				
	Sm50	48,7124031689018	14,6955441590398				
Pelhřimov	Sm51	49,2795099969953	14,9936740379780				
	Sm52	49,2791820131242	14,9941760301589				
	Sm53	49,2789680231362	14,9949960317462				
	Sm54	49,2788889817893	14,9954149592667				
	Sm55	49,2787550389766	14,9950439762324				
	Sm56	49,2785350140184	14,9947249609977				
	Sm57	49,2783180065453	14,9944650381803				
	Sm58	49,2777300160378	14,9943330232053				
	Sm59	49,2781099677085	14,9932960141450				
	Sm60	49,2790690250694	14,9928820319473				
	Sm61	49,3264528457075	15,1810198836028				
	Sm62	49,3268859386444	15,1809227373450				
	Sm63	49,3274336121976	15,1805088389664				
	Sm64	49,3278674595057	15,1802520174533				
	Sm65	49,3276719935238	15,1800771709531				
	Sm66	49,3271820712834	15,1795669645071				
	Sm67	49,3269211426377	15,1796154119074				
	Sm68	49,3269108328968	15,1798697188496				
	Sm69	49,3262019753456	15,1803156360983				

	Sm70	49,3258859775960	15,1809566002339	
--	------	------------------	------------------	--

Tabulka 79 Ukázka kvantitativních a kvalitativních parametrů izolované DNA smrku ztepilého

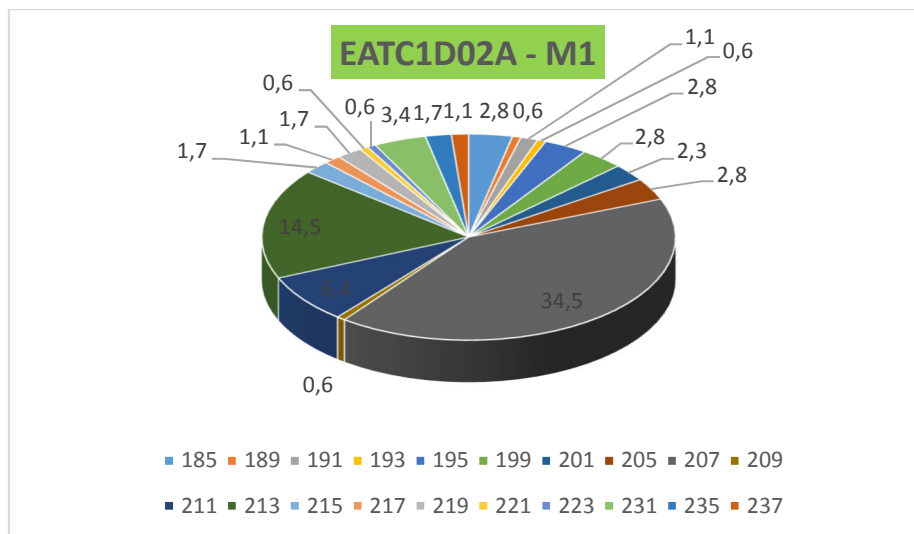
ID	C (ng/ul)	koeficient 260/280	ID	C (ng/ul)	koeficient 260/280
lcr_s1	44,7	1,79	lcr_s51	31,9	1,89
lcr_s2	76	1,83	lcr_s52	31,5	1,81
lcr_s3	63	1,87	lcr_s53	42,5	1,78
lcr_s4	42,1	1,88	lcr_s54	27,4	1,77
lcr_s5	64,4	1,84	lcr_s55	17,3	1,83
lcr_s6	83,6	1,86	lcr_s56	48,7	1,87
lcr_s7	86	1,84	lcr_s57	66,8	1,8
lcr_s8	85,5	1,85	lcr_s58	45,1	1,9
lcr_s9	70,4	1,84	lcr_s59	78,5	1,84
lcr_s10	58,1	1,85	lcr_s60	17,6	1,69
lcr_s11	58,5	1,82	lcr_s61	25,4	1,85
lcr_s12	54,3	1,86	lcr_s62	26,8	1,86
lcr_s13	33,9	1,8	lcr_s63	52,9	1,85
lcr_s14	43,6	1,81	lcr_s64	31,9	1,75
lcr_s15	31,3	1,88	lcr_s65	31,9	1,88
lcr_s16	14	1,94	lcr_s66	50,4	1,81
lcr_s17	33,9	1,78	lcr_s67	47,8	1,79
lcr_s18	43,4	1,84	lcr_s68	72,2	1,83
lcr_s19	26,9	1,81	lcr_s69	20,2	1,73
lcr_s20	33,6	1,84	lcr_s70	19,2	1,86
lcr_s21	38	1,83	lcr_s71	56,9	1,78
lcr_s21j	68,9	1,88	lcr_s72	49,5	1,82
lcr_s22	18,3	1,77	lcr_s73	42,9	1,81
lcr_s22j	39,7	1,81	lcr_s74	67,2	1,84
lcr_s23	13,6	1,83	lcr_s75	101	1,88
lcr_s23j	25,5	1,8	lcr_s76	44,8	1,83
lcr_s24	21,1	1,83	lcr_s77	25,1	1,86
lcr_s24j	43,8	1,75	lcr_s78	58,3	1,81
lcr_s25	23,4	1,84	lcr_s79	85,1	1,85
lcr_s25j	30,9	1,85	lcr_s80	48,4	1,81
lcr_s26	17,7	1,86	lcr_s81	30,8	1,77
lcr_s26j	13,7	1,8	lcr_s82	25,5	1,7
lcr_s27	51,5	1,85	lcr_s83	37,4	1,78
lcr_s27j	22,9	1,84	lcr_s84	77	1,76
lcr_s28	20,4	1,75	lcr_s85	16,4	1,83
lcr_s28j	53,9	1,83	lcr_s86	39,7	1,79
lcr_s29	31,8	1,83	lcr_s87	57	1,86
lcr_s29j	61,7	1,83	lcr_s88	36,7	1,87



lcr_s30	45,3	1,84	lcr_s89	49,1	1,87
lcr_s30j	47,6	1,84	lcr_s90	44,4	1,94
lcr_s31	43,1	1,89	lcr_s91	52,1	1,79
lcr_s32	46,9	1,86	lcr_s92	46,2	1,79
lcr_s33	42,4	1,85	lcr_s93	39,7	1,8
lcr_s34	18,1	1,95	lcr_s94	25,6	1,87
lcr_s35	36,8	1,84	lcr_s95	27	1,84
lcr_s36	25,7	1,85	lcr_s96	30,8	1,8
lcr_s37	57,6	1,86	lcr_s97	37	1,88
lcr_s38	19	1,8	lcr_s98	18,1	1,7
lcr_s39	17,4	1,81	lcr_s99	49,8	1,84
lcr_s40	21,7	1,83	lcr_s100	48,4	1,88
lcr_s41	43,4	1,86	lcr_s101	73,3	1,86
lcr_s42	63,1	1,84	lcr_s102	55,8	1,77
lcr_s43	33,5	1,75	lcr_s103	32,5	1,85
lcr_s44	35,9	1,84	lcr_s104	78,9	1,81
lcr_s45	27,4	1,82	lcr_s105	43,5	1,82
lcr_s46	34,8	1,79	lcr_s106	35,6	1,82
lcr_s47	42,7	1,8	lcr_s107	32,9	1,82
lcr_s48	33,9	1,81	lcr_s108	53,3	1,83
lcr_s49	19,3	1,77	lcr_s109	35	1,74
lcr_s50	73,1	1,88	lcr_s110	24,6	1,74

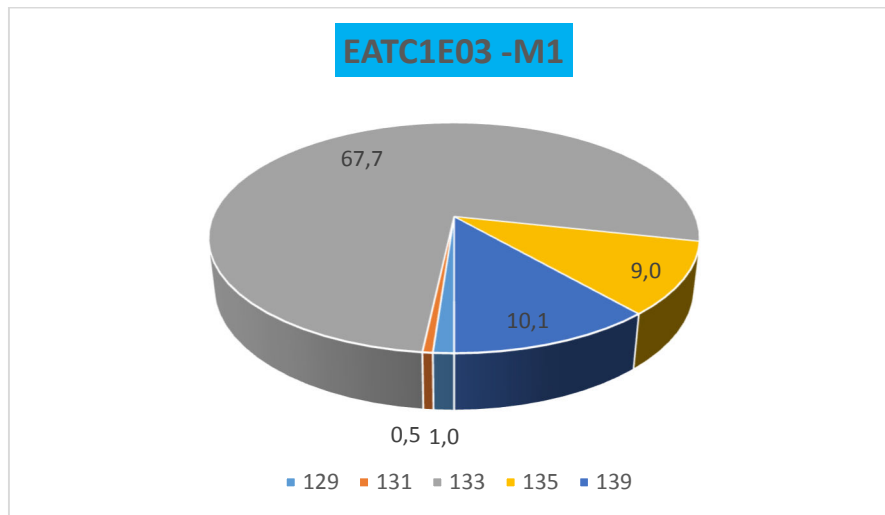
### 16.5.1. Charakteristika jednotlivých mikrosatelitových lokusů smrku ztepilého

První pozorovaný lokus EATC1D02A obsahuje alely, které se vyskytují od hodnot 185 po 237 bp. Tento lokus je naznačen zelenou barvou. Dominantní zastoupení v tomto lokusu zastává alela na délce 207, v závěsu potom co do četnosti se vyskytují alely 213 a 211. Tento lokus se řadí mezi velice polymorfní lokusy a celkově obsahuje 20 pozic alel, které byly na vzorcích detekovány.



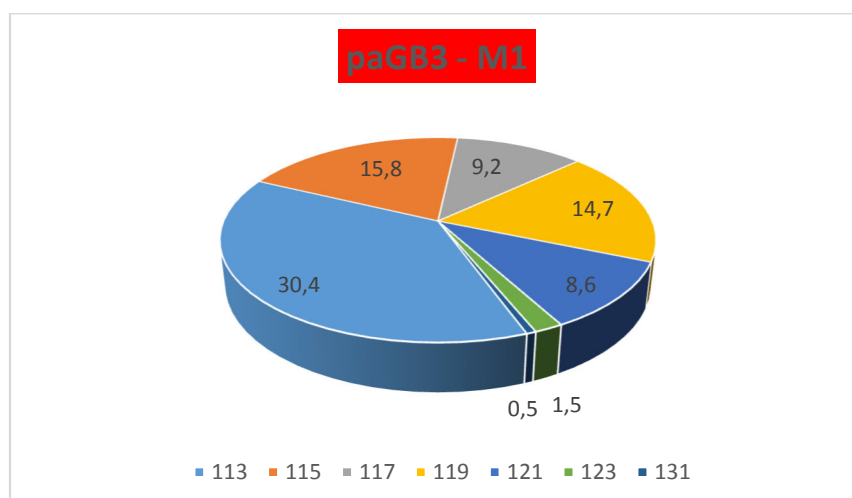
Obrázek 103 Lokus EATC1D02A - M1

Lokus s označením EATC1E03 obsahuje alely v rozmezí od 129 do 139 bp. Modře naznačený lokus se řadí mezi středně polymorfní lokusy vylišující 5 alel. Největší zastoupení představuje alela, jejíž délka je 133 bp.



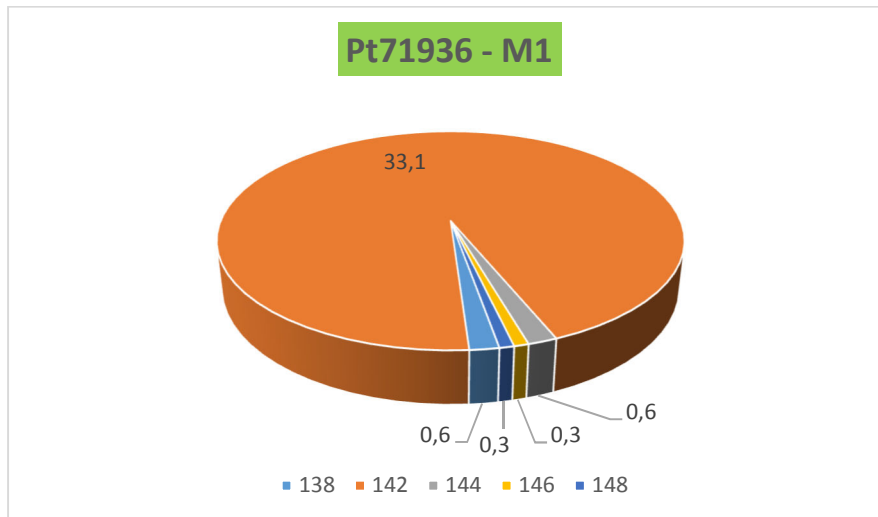
Obrázek 104 Lokus EATC1E03- M1

Lokus s názvem paGB3 je naznačen červenou fluorescenční barvou. Vyskytuje se od hodnot 113 až 131 bp. Tvoří většinou ukázkové jednovrcholové peaky. Alely se vždy nachází na liché pozici a v případě nejasné alely se vždy beré za vrchol pravá hodnota. Na grafu je patrné, že tento lokus je středně polymorfní, bylo na něm detekováno 7 alel, z nichž nejvíce zastoupená je alela o délce 113 bp.



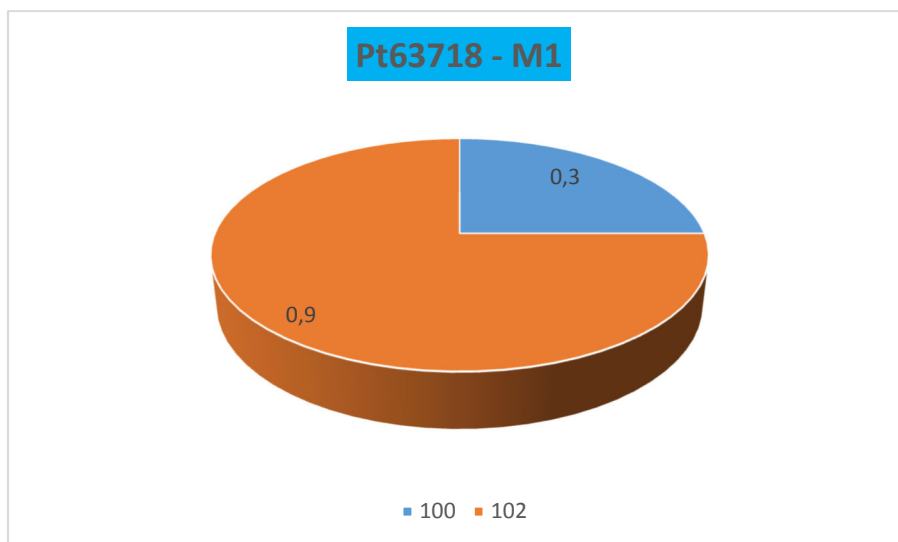
Obrázek 105 Lokus paGB3 - M1

Chloroplastový lokus Pt71936 se obecně řadí mezi méně polymorfní. I přes nízkou míru polymorfismu jsou chloroplastové markery velmi užitečný nástroj k identifikaci rodičovského stromu či haplotypové linie díky uniparentální dědičnosti chloroplastové DNA. Tento lokus obsahuje dominantní alelu o hodnotě 142 a velmi vzácné alely od hodnot 138 po 148 bp vždy na sudých pozicích. Tento marker je naznačen zeleně.



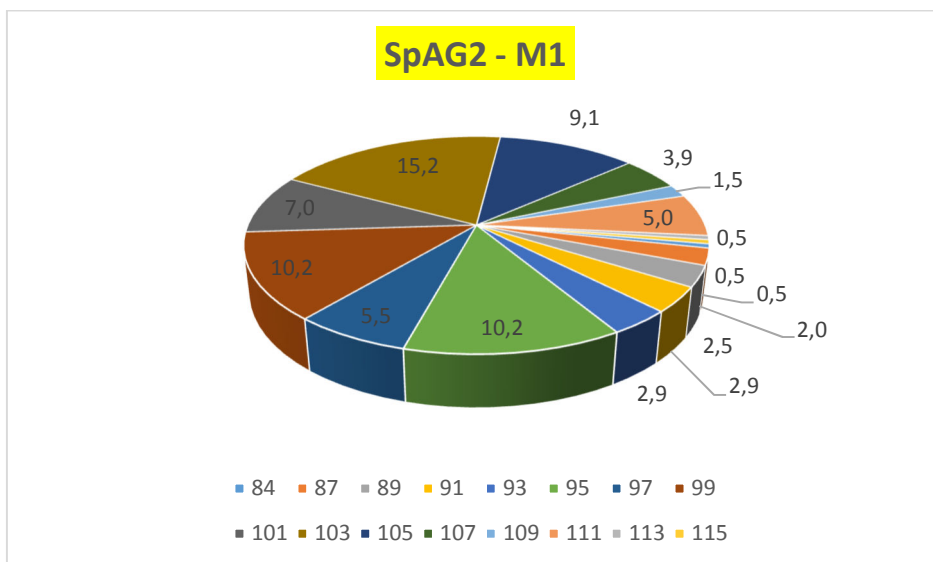
Obrázek 106 Lokus Pt71936 - M1

Druhý chloroplastový lokus Pt 63718 je naznačen modrou barvou. Je na něm detekována čteně zastoupená alela 102 bp a alela s délkou 100bp.



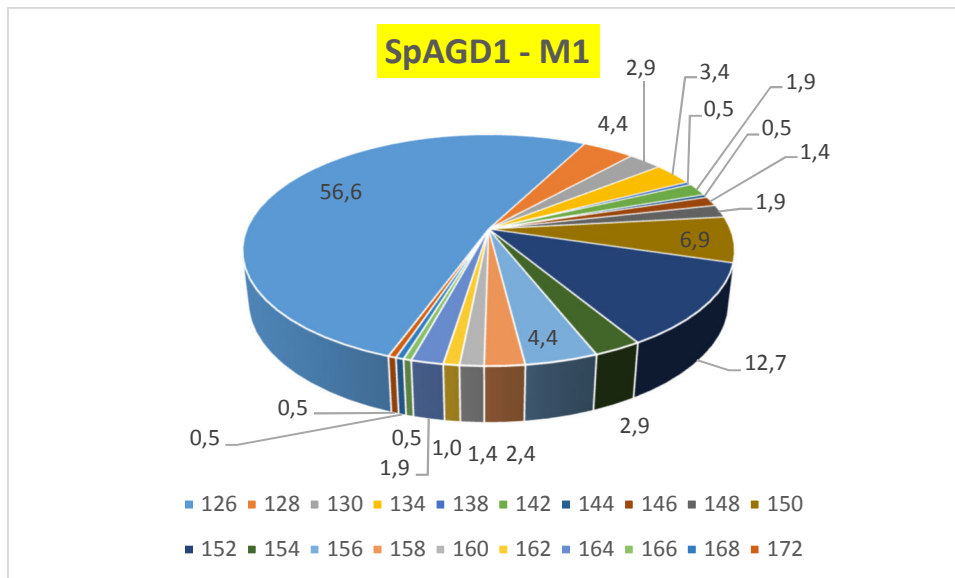
Obrázek 107 Lokus Pt63718 - M1

První ze žlutě naznačených prumerů je lokus SpAG2. Žlutě naznačený lokus se v programu zobrazuje černě pro jasnou čitelnost. Tento lokus se nachází v rozmezí hodnot od 83 do 115. Je preferován vždy pravý vrchol v případě dvojrcholů a alely jsou detekovány na lichých pozicích. Jedná se o vysoce polymorfní lokus, na kterém bylo v testovací populaci detekováno 16 různých alel.



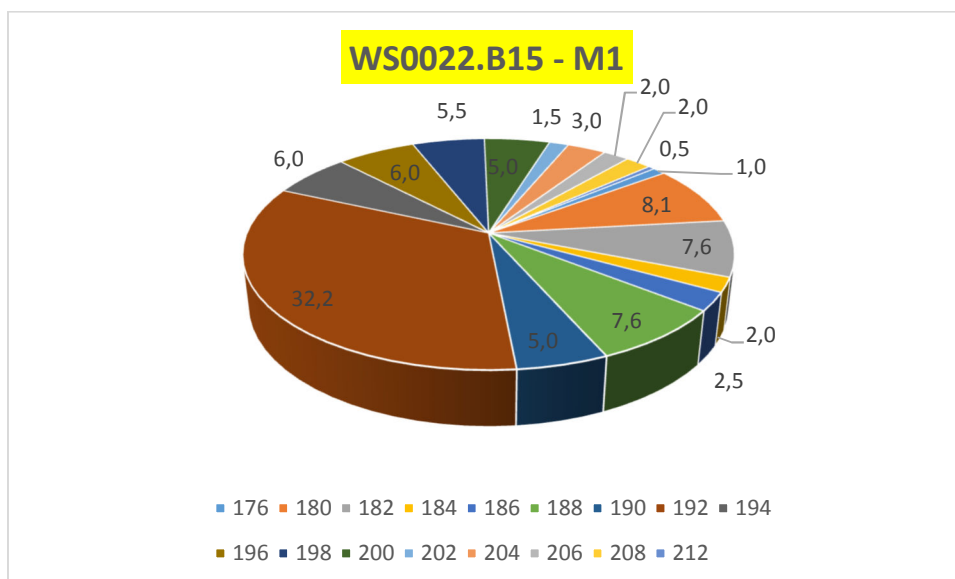
Obrázek 108 Lokus SpAG2 - M1

Další žlutě naznačený lokus s názvem SpAGD1 je typický pro své časté tvoření hřebínků. Vyskytuje se v rozmezí délek od 126 do 172 bp. Lokus se vyznačuje velkou mírou polymorfismu, obsahuje 20 alel se sudou hodnotou. Nejčastěji zastoupenou hodnotou je alela o délce 92 bp, druhá nejčetnější je alela o délce 152 bp.



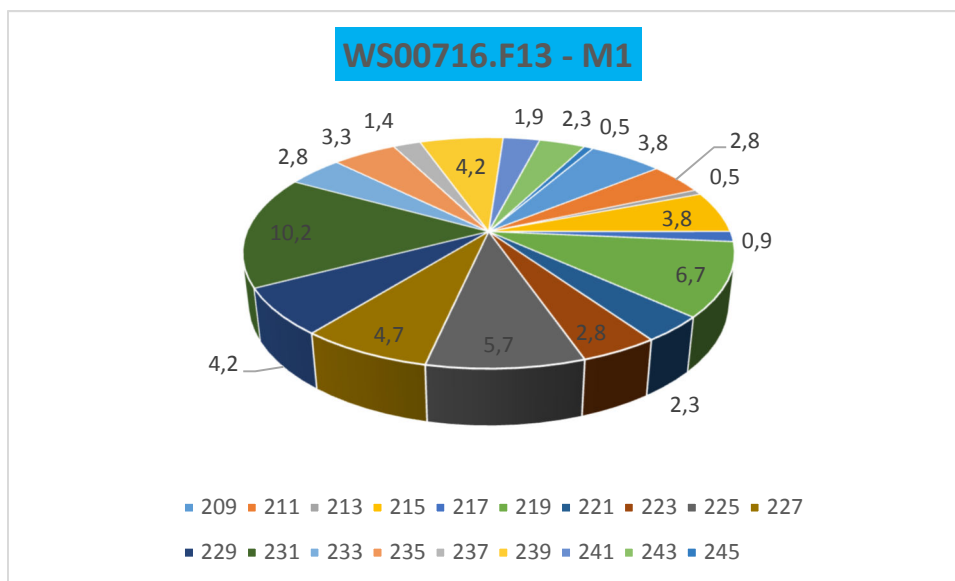
Obrázek 109 Lokus SpAGD1 - M1

Lokus WS002.B15 je žlutě naznačen. Jeho rozšíření je mapováno od hodnot 176 po 212 bp. Tvoří typicky dvojrcholy, z nichž jsou voleny vždy levé se sudou hodnotou. Lokus má vysokou míru polymorfismu, obsahuje dohromady 17 pozic alel. Nejčastěji zastoupená je alela o hodnotě 192 bp.



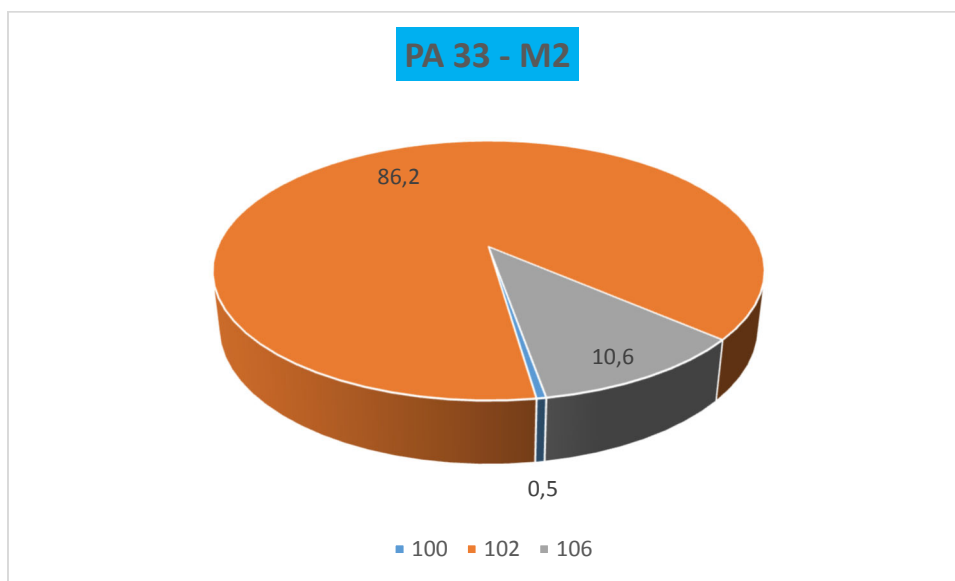
Obrázek 110 Lokus WS0022.B15 - M1

Lokus s názvem WS00716.F13 je modře naznačen, nachází se v rozmezí hodnot od 209 do 245 bp. V tomto případě jsou skórovány vždy liché hodnoty. Tento lokus je řazen také mezi vysoce polymorfní lokusy s 19 detekovanými alelami, které jsou čteně zastoupené napříč zkoumanými vzorky.



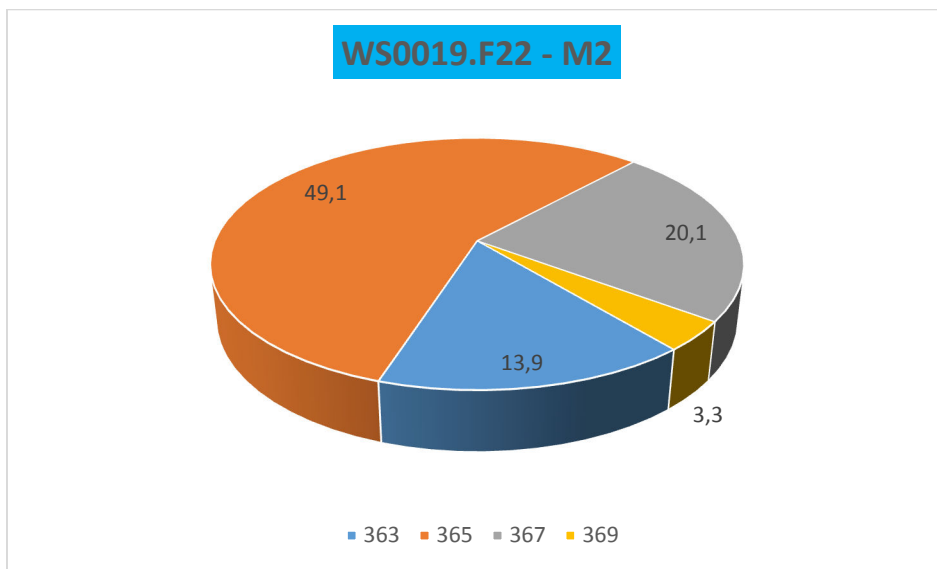
Obrázek 111 Lokus WS00716.F13 - M1

Lokus s názvem PA 33 patří mezi méně polymorfní lokusy. Je modře naznačen a obsahuje alely v rozmezí 100 – 106 bp. Dominantní je alela o hodnotě 102 bp.



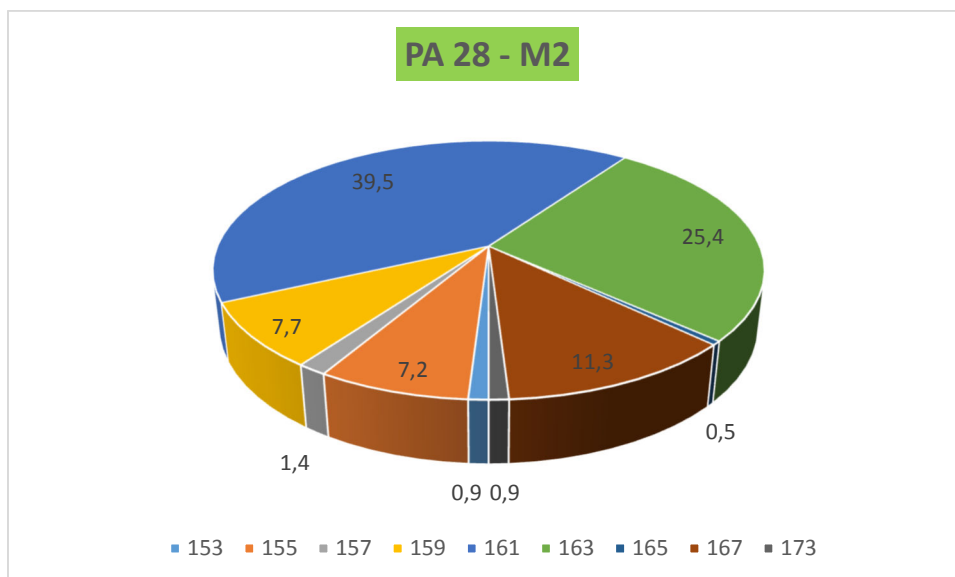
Obrázek 112 Lokus PA 33 – M2

Lokus s názvem WS0019.F22 je modře naznačen. Tento lokus obsahuje alely v rozmezí hodnot od 363 do 369 bp. Jsou vylišovány vždy liché hodnoty. Dominantní alelou pro tento lokus je alely délky 365 bp.



Obrázek 113 Lokus WS0019.F22 – M2

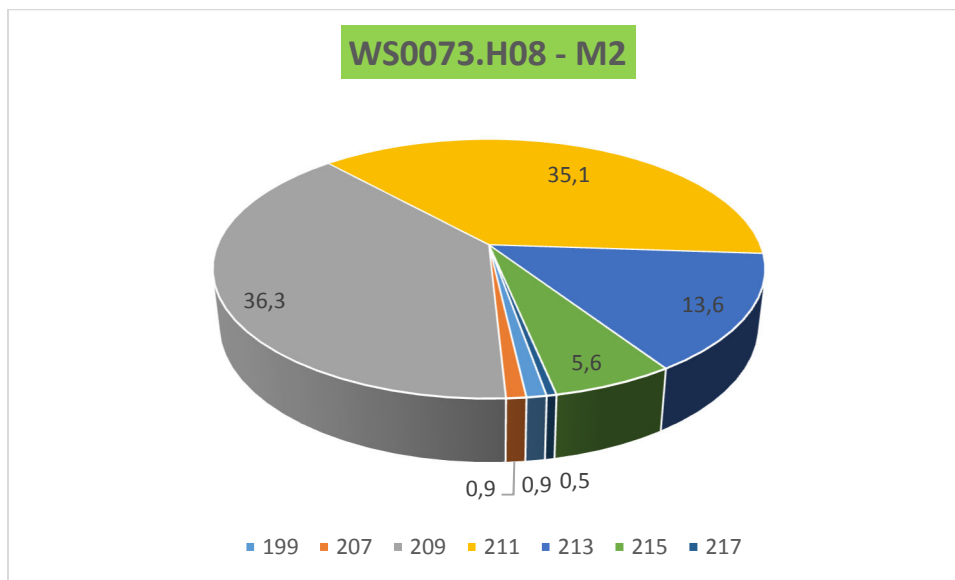
Lokus PA 28 obsahuje alely v délce od 153 po 173 bp. Tento lokus je naznačen zelenou barvou a jako nejčastěji detekovaná alela se projevila alela o délce 161 bp.



Obrázek 114 Lokus PA 28 – M2

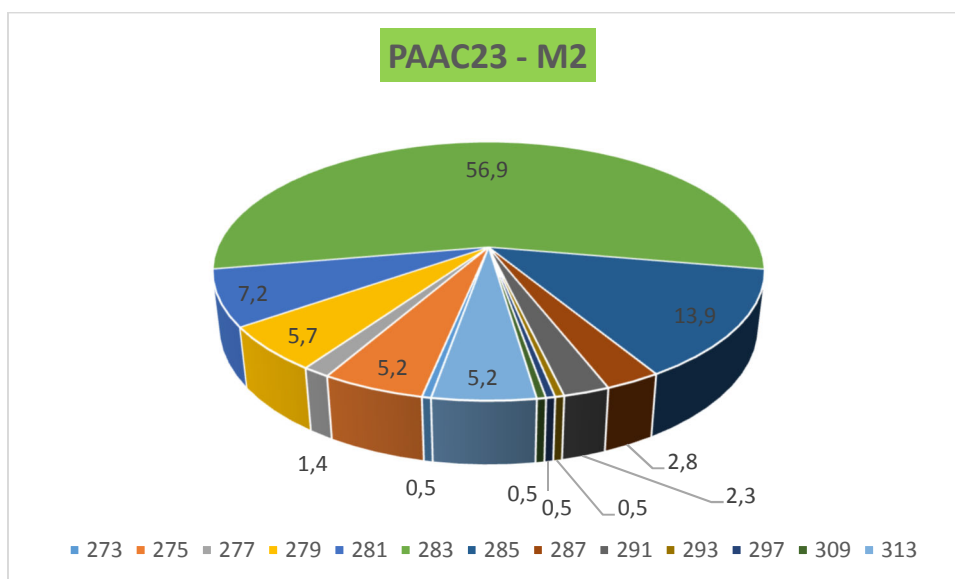


Mezi další zeleně naznačené lokusy patří i lokus s názvem WS0073.H08. Tento lokus vylišuje celkem 7 alel v hodnotách od 199 do 217 bp. Lze jej hodnotit jako středně polymorfní lokus, který obsahuje tři často se opakující alely a to délkách 209,211 a 213 bp.



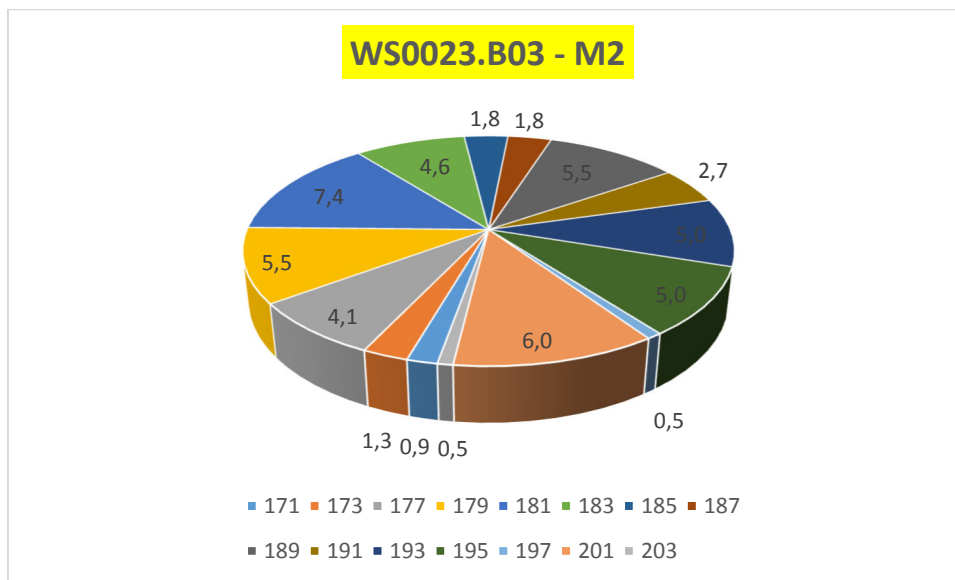
Obrázek 115 Lokus WS0073.H08– M2

Zeleně naznačený lokus z multiplexu 2 je lokus PAAC23. Tento lokus považujeme za vysoce polymorfní. Obsahuje 13 alel v rozmezí délek 273 až 313 bp. Jako dominantní se projevila alela o délce 283 bp.



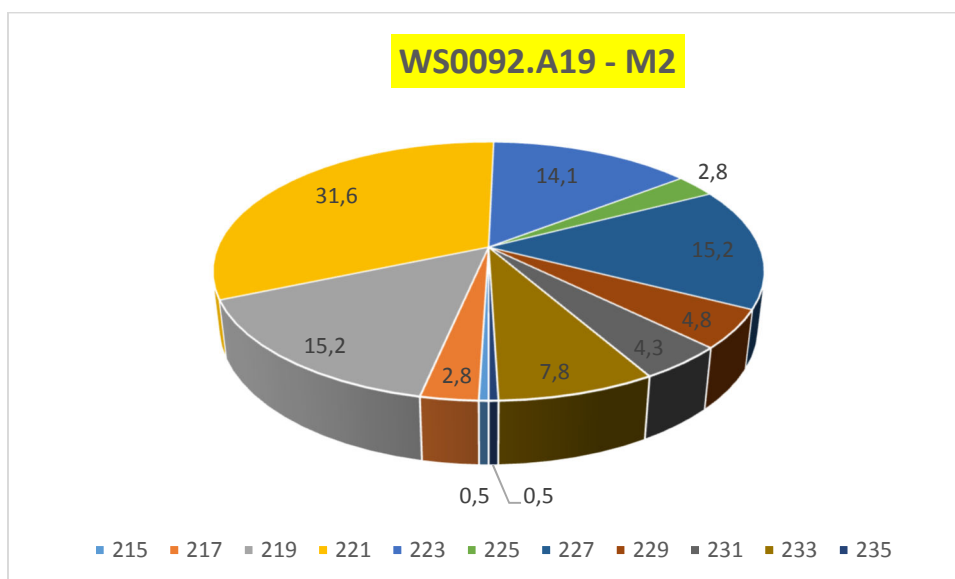
Obrázek 116 Lokus PAAC23 – M2

Lokus s názvem WS0023.B03 je další zástupce jehož míra polymorfismu je velmi vysoká. Obsahuje 14 alel o délkách od 171 do 203 bp. Lokus je žlutě naznačen a patří mezi lokusy, které vykazují vysokou míru detekovaných alel mezi jedinci testovací populace.



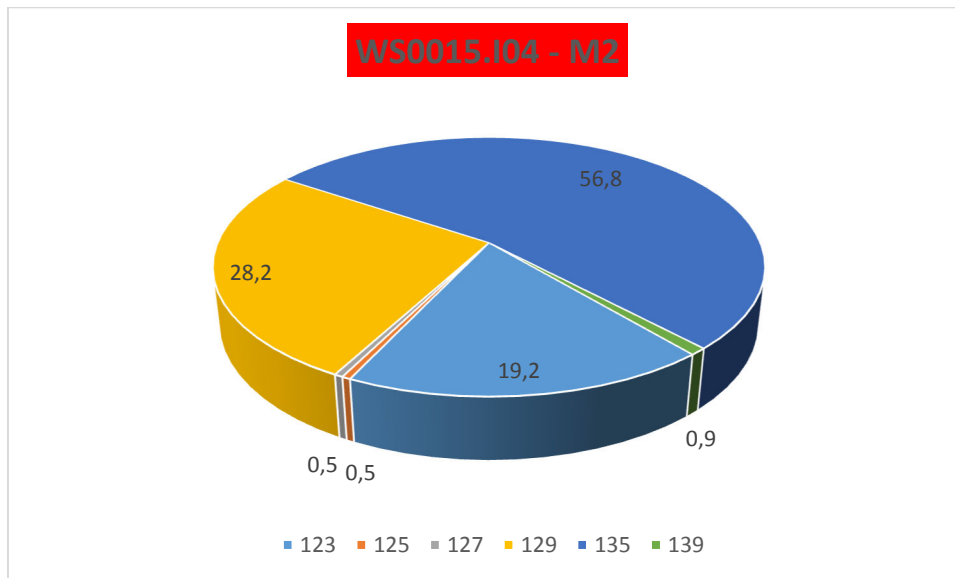
Obrázek 117 Lokus WS0023.B03 – M2

Druhý žlutě naznačený lokus multiplexu 2 je WS0092.A19, který se svou mírou polymorfismu rovná předchozímu lokusu. Alely se nachází v rozmezí délek od 215 do 235 bp, vždy se jedná o liché hodnoty.



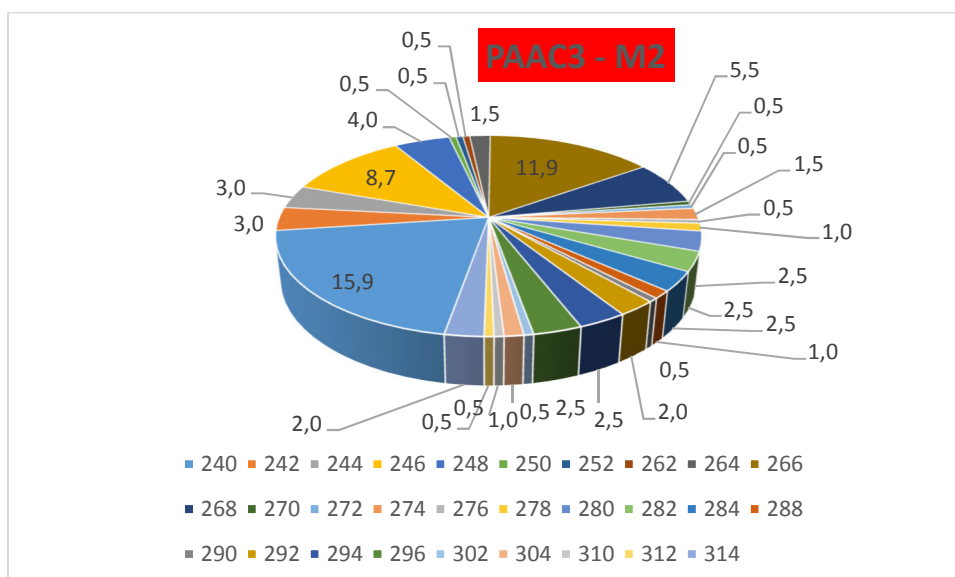
Obrázek 118 Lokus WS0092.A19 – M2

První z červeně naznačených lokusů druhého multiplexu je lokus WS0015.I04. Na tomto lokusu bylo detekováno 6 alel lichých hodnot o hodnotách od 123 do 139 bp. Dominantní alela má délku 135 bp.



Obrázek 119 Lokus WS0015.I04 – M2

Poslední lokus multiplexu 2 s názvem PAAC3 je naznačen červeně. Vylíčuje vždy sudé alely o délkách od 240 do 314. Jedná se o nejpolymorfnější lokus, který vylíčil 29 alel, z nich nejvíce zastoupená alela o délce 240 bp.



Obrázek 120 Lokus PAAC3 – M2

## 17. Citované a doporučené zdroje

### 17.1. Obecné zásady

- AVISE J. C., 2012. Molecular markers, natural history and evolution. Springer Science & Business Media.
- ADAMS, W.T., BURCZYK, J., 2000 Magnitude and implication of gene flow in gene conservation reserves. In: Forest Conservation Genetics: Principles and Practices, Young, A., Boshier, D. and Boyele, T. (eds), CSIRO Publishing, Collingwood, Victoria, Australia, s. 215-224 str.
- BIRT T. P., BAKER A. J., 2000. Polymerase chain reaction. Molecular methods in ecology: 50-64 str.
- CLARK, M. S., 2013. Plant molecular biology - a laboratory manual. Springer Science & Business Media.
- CHASE M., HILLS H., 1991. Silica Gel: An Ideal Material for Field Preservation of Leaf Samples for DNA Studies. Taxon, 40(2): 215–220 str.
- FLORES-RENTERÍA L., KROHN A., 2013. Scoring Microsatellite Loci. Microsatellites: Methods and Protocols: 319-336 str.
- JARDE P., LAGODA P. J., 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. Trends in ecology & evolution. 11: 424-429 str.
- JONES A. G., ARDREN W. R., 2003. Methods of parentage analysis in natural populations. Molecular ecology. 12: 2511-2523 str.
- PRITCHARD J. K., STEPHENS M., DONNELLY P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics. 155: 945-959 str.
- SOFTGENETICS., 2014. GeneMarker. The Biologist Friendly Software. User Manual: 207str.
- ŠMARDA J., DOŠKAŘ J., PANTŮČEK R., RŮŽIČKOVÁ V., KOPTÍKOVÁ J., 2005. Metody molekulární biologie. Masarykova univerzita v Brně: 188str.
- ÚHÚL., 2016. Zprávy o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky. [online]. Brandýs nad Labem, ÚHÚL. [cit. 2017-01-29]. Dostupné na World Wide Web: <http://www.uhul.cz/zelenazprava/>
- VARSHNEY R. K., GRANER A., SORRELLS C., 2005. Genic microsatellite markers in plants: Features and applications. Trends in Biotechnology. 23: 48-55 str
- WHITE, T.L., ADAMS, W., NEALE, D. B., 2007: Forest genetics. Cambridge, MA: CABI Publishers. Wallingford, Oxfordshire, UK, Cambridge, MA, s. 682. ISBN 08-519-9083-5.
- WRIGHT, J.W., 1976. Introduction to forest genetics. New York, San Francisco, London; Academic Press, 463 str.
- ZORNÍKOVÁ, G., 2012. Využití polymerázové řetězové reakce (PCR) pro detekci probiotických mikroorganismů. Brno: Mendelova univerzita v Brně.

## 17.2. Buk lesní

ASUKA, Y., TANI, N., TSUMURA, Y., ET TOMARU, N., 2004. DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF MICROSATELLITE MARKERS FOR FAGUS CRENATA BLUME. MOLECULAR ECOLOGY NOTES, 4(1), 101–103 STR.

BALÁŠ M., KUNEŠ I., 2014. BIOLOGICKÉ ZÁKLADY PĚSTOVÁNÍ LESŮ. PRAHA: KATEDRA PĚSTOVÁNÍ LESŮ, FAKULTA LESNICKÁ A DŘEVAŘSKÁ, ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE.

COMPS, B., THIÉBAUT, B., PAULE, L., MERZEAU, D., ET LETOUZEY, J., 1990. ALLOZYMIC VARIABILITY IN

COUTINHO, J. P., CARVALHO, A., ET LIMA-BRITO, J., 2014. GENETIC DIVERSITY ASSESSMENT AND ESTIMATION OF PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS AMONG 26 FAGACEAE SPECIES USING ISSRS. BIOCHEMICAL SYSTEMATICS AND ECOLOGY, 54, 247–256 STR.

DE LAFONTAINE, G., DUCOUSSO, A., LEFÈVRE, S., MAGNANOU, E., ET PETIT, R. J. (2013). STRONGER SPATIAL GENETIC STRUCTURE IN RECOLONIZED AREAS THAN IN REFUGIA IN THE EUROPEAN BEECH. MOLECULAR ECOLOGY, 22(17), 4397–4412 STR.

DITTMAR, C., ZECH, W., ET ELLING, W. (2003). GROWTH VARIATIONS OF COMMON BEECH (FAGUS SYLVATICA L.) UNDER DIFFERENT CLIMATIC AND ENVIRONMENTAL CONDITIONS IN EUROPE - A DENDROECOLOGICAL STUDY. FOREST ECOLOGY AND MANAGEMENT, 173(1–3), 63–78 STR.

GEßLER, A., KEITEL, C., KREUZWIESER, J., MATYSSEK, R., SEILER, W., ET RENNENBERG, H. (2007). POTENTIAL RISKS FOR EUROPEAN BEECH (FAGUS SYLVATICA L.) IN A CHANGING CLIMATE. TREES - STRUCTURE AND FUNCTION, 21(1), 1–11 STR.

GRONAU, I., & MORAN, S. (2007). OPTIMAL IMPLEMENTATIONS OF UPGMA AND OTHER COMMON CLUSTERING ALGORITHMS. INFORMATION PROCESSING LETTERS, 104(6), 205-210 STR.

HASENKAMP, N., ZIEGENHAGEN, B., MENGEL, C., SCHULZE, L., SCHMITT, H. P., ET LIEPELT, S. (2011). TOWARDS A DNA MARKER ASSISTED SEED SOURCE IDENTIFICATION: A PILOT STUDY IN EUROPEAN BEECH (FAGUS SYLVATICA L.). EUROPEAN JOURNAL OF FOREST RESEARCH, 130(4), 513–519 STR.

JAZBEC, A., ŠEGOTIĆ, K., IVANKOVIĆ, M., MARJANOVIĆ, H., ET PERIĆ, S. (2007). RANKING OF EUROPEAN BEECH PROVENANCES IN CROATIA USING STATISTICAL ANALYSIS AND ANALYTICAL HIERARCHY PROCESS. FORESTRY, 80(2), 151–162 STR.

JOMBART, T., DEVILLARD, S., & BALLOUX, F. (2010). DISCRIMINANT ANALYSIS OF PRINCIPAL COMPONENTS: A NEW METHOD FOR THE ANALYSIS OF GENETICALLY STRUCTURED POPULATIONS. BMC GENETICS, 11(1), 94 STR.

JUMP, A. S., HUNT, J. M., MARTÍNEZ-IZQUIERDO, J. A., ET PEÑUELAS, J. (2006)A. NATURAL SELECTION AND CLIMATE CHANGE: TEMPERATURE-LINKED SPATIAL AND TEMPORAL TRENDS IN GENE FREQUENCY IN FAGUS SYLVATICA. MOLECULAR ECOLOGY, 15(11), 3469–3480 STR.

JUMP, A. S., HUNT, J. M., ET PEÑUELAS, J. (2006)B. RAPID CLIMATE CHANGE-RELATED GROWTH DECLINE AT THE SOUTHERN RANGE EDGE OF FAGUS SYLVATICA. GLOBAL CHANGE BIOLOGY, 12(11), 2163–2174 STR.

KRAJ, W., ET SZTORC, A. (2009). GENETIC STRUCTURE AND VARIABILITY OF PHENOLOGICAL FORMS IN THE EUROPEAN BEECH (FAGUS SYLVATICA L.). ANNALS OF FOREST SCIENCE, 66(2), 1–7 STR.

KRAMER, K., DEGEN, B., BUSCHBOM, J., HICKLER, T., THUILLER, W., SYKES, M. T., ET DE WINTER, W. (2010). MODELLING EXPLORATION OF THE FUTURE OF EUROPEAN BEECH (FAGUS SYLVATICA L.) UNDER CLIMATE CHANGE - RANGE, ABUNDANCE, GENETIC DIVERSITY AND ADAPTIVE RESPONSE. FOREST ECOLOGY AND MANAGEMENT, 259(11), 2213–2222 STR.

KREMER, A., CASASOLI, M., BARRENECHE, T., BODÉNÉS, C., ET SISCO, P. (2007). 5 FAGACEAE TREES. IN: KOLE, C. [ED.]: FOREST TREES. HEIDELBERG: SPRINGER-VERLAG BERLIN HEIDELBERG.

LEFÈVRE, S., WAGNER, S., PETIT, R. J., ET DE LAFONTAINE, G. (2012). MULTIPLEXED MICROSATELLITE MARKERS FOR GENETIC STUDIES OF BEECH. *MOLECULAR ECOLOGY RESOURCES*, 12(3), 484–491 STR.

LESUR, I., BECHADE, A., LALANNE, C., KLOPP, C., NOIROT, C., LEPLÉ, J. C., ... LE PROVOST, G. (2015). A UNIGENE SET FOR EUROPEAN BEECH (*FAGUS SYLVATICA* L.) AND ITS USE TO DECIPHER THE MOLECULAR MECHANISMS INVOLVED IN DORMANCY REGULATION. *MOLECULAR ECOLOGY RESOURCES*, 15(5), 1192–1204 STR.

MAGRI, D., VENDRAMIN, G. G., COMPS, B., DUPANLOUP, I., GEBUREK, T., GÖMÖRY, D., ... VAN DER KNAAP, W. O. (2006). A NEW SCENARIO FOR THE QUATERNARY HISTORY OF EUROPEAN BEECH POPULATIONS: PALAEOBOTANICAL EVIDENCE AND GENETIC CONSEQUENCES. *NEW PHYTOLOGIST*, 171(1), 199–221 STR.

NYÁRI, L. (2010). GENETIC DIVERSITY, DIFFERENTIATION AND SPATIAL GENETIC STRUCTURES IN DIFFERENTLY MANAGED ADULT EUROPEAN BEECH (*FAGUS SYLVATICA* L.) STANDS AND THEIR REGENERATION. *FORSTARCHIV*, 81(4), 156–164 STR.

PACKHAM, J. R., THOMAS, P. A., ATKINSON, M. D., ET DEGEN, T. (2012). BIOLOGICAL FLORA OF THE BRITISH ISLES: *FAGUS SYLVATICA*. *JOURNAL OF ECOLOGY*, 100(6), 1557–1608 STR.

PASTORELLI, R., SMULDERS, M., WESTENDE, W., VOSMAN, B., GIANNINI, R., C., V., ET G., V. (2003). CHARACTERIZATION OF MICROSATELLITE MARKERS IN *FAGUS SYLVATICA* L. AND *FAGUS ORIENTALIS* LIPSKY. *MOLECULAR ECOLOGY NOTES*, 3, 76–78 STR.

PAULE, L. (1982). UNTERSUCHUNGEN ZUM WACHSTUM DER SLOWAKISCHEN PROVENIENZEN DER ROTBUCHE (*FAGUS SYLVATICA* L.). *SILVAE GENETICA*, 31(4), 131–136 STR.

PEAKALL, R., ET SMOUSE, P. E. (2006). GENALEX 6: GENETIC ANALYSIS IN EXCEL. POPULATION GENETIC SOFTWARE FOR TEACHING AND RESEARCH. *MOLECULAR ECOLOGY NOTES*, 6(1), 288–295 STR.

PEAKALL, R., ET SMOUSE, P. E. (2012). GENALEX 6.5: GENETIC ANALYSIS IN EXCEL. POPULATION GENETIC SOFTWARE FOR TEACHING AND RESEARCH-AN UPDATE. *BIOINFORMATICS*, 28(19), 2537–2539 STR.

PLUESS, A. R., ET MÄÄTTÄNEN, K. (2013). CHARACTERIZATION OF EIGHTEEN NOVEL MICROSATELLITE MARKERS AND MULTIPLEX PCR PROTOCOL FOR *FAGUS SYLVATICA*. *CONSERVATION GENETICS RESOURCES*, 5(2), 311–314 STR.

RAJENDRA, K. C., SEIFERT, S., PRINZ, K., GAILING, O., ET FINKELDEY, R. (2014). SUBTLE HUMAN IMPACTS ON NEUTRAL GENETIC DIVERSITY AND SPATIAL PATTERNS OF GENETIC VARIATION IN EUROPEAN BEECH (*FAGUS SYLVATICA*). *FOREST ECOLOGY AND MANAGEMENT*, 319, 138–149 STR.

SCALFI, M., TROGGIO, M., PIOVANI, P., LEONARDI, S., MAGNASCHI, G., VENDRAMIN, G. G., ET MENOZZI, P. (2004). A RAPD, AFLP AND SSR LINKAGE MAP, AND QTL ANALYSIS IN EUROPEAN BEECH (*FAGUS SYLVATICA* L.). *THEORETICAL AND APPLIED GENETICS*, 108(3), 433–441 STR.

SLATE, J., MARSHALL, T. C., ET PEMBERTON, J. M. (2000). A RETROSPECTIVE ASSESSMENT OF THE ACCURACY OF THE PATERNITY INFERENCE PROGRAMM CERVUS. *MOLECULAR ECOLOGY*, 9, 801–808 STR.

TANAKA, K., TSUMURA, Y., ET NAKAMURA, T. (1999). DEVELOPMENT AND POLYMORPHISM OF MICROSATELLITE MARKERS FOR *FAGUS CRENATA* AND THE CLOSELY RELATED SPECIES, *F. JAPONICA*. *THEORETICAL AND APPLIED GENETICS*, 99(1–2), 11–15 STR.

TROGGIO, M., DIMASSO, E., LEONARDI, S., CERONI, M., BUCCI, G., PIOVANI, P., ET MENOZZI, P. (1996). INHERITANCE OF RAPD AND I-SSR MARKERS AND POPULATION PARAMETERS ESTIMATION IN EUROPEAN BEECH (*FAGUS SYLVATICA* L.). *FOREST GENETICS*, 3(4), 173–181 STR.

ÚHÚL., 2016. ZPRÁVY O STAVU LESA A LESNÍHO HOSPODÁŘSTVÍ ČESKÉ REPUBLIKY. [ONLINE]. BRANDÝS NAD LABEM, ÚHÚL. [CIT. 2017-01-29]. DOSTUPNÉ NA WORLD WIDE WEB: [HTTP://WWW.UHUL.CZ/ZELENAZPRAVA/](http://www.uhul.cz/zelenazprava/)

ÚRADNÍČEK, L. (2014). *FOREST DENDROLOGY*. BRNO: MENDELOVA ZEMĚDĚLSKÁ A LESNICKÁ UNIVERZITA V BRNĚ.

VORNAM, B., DECARLI, N., ET GAILING, O. (2004). SPATIAL DISTRIBUTION OF GENETIC VARIATION IN A NATURAL BEECH STAND (*FAGUS SYLVATICA* L.) BASED ON MICROSATELLITE MARKERS. *CONSERVATION GENETICS*, 5(4), 561–570 STR.

WÜHLISCH, G. V. (2008). TECHNICAL GUIDELINES FOR GENETIC CONSERVATION AND USE FOR EUROPEAN BEECH (*FAGUS SYLVATICA*). EUFORGEN, 6 STR.

### 17.3. Dub zimní

DUCOUSSO, A., GUYON, J. P. AND KREMER, A. (1996) 'Latitudinal and altitudinal variation of bud burst in western populations of sessile oak (*Quercus petraea* (Matt) Liebl)', *Annales des Sciences Forestieres*, 53(2–3), 775–782 str.

DURAND, J., BODÉNÈS, C., CHANCEREL, E., FRIGERIO, J. M., VENDRAMIN, G., SEBASTIANI, F., ... & MATTIONI, C. (2010). A fast and cost-effective approach to develop and map EST-SSR markers: oak as a case study. *BMC genomics*, 11(1), 570 str.

GOMORY, D. ET AL. (2001) 'Genetic differentiation of oak populations within the *Quercus robur* / *Quercus petraea* complex in Central and Eastern Europe', *Heredity*, 86. 557–563 str.

GRONAU, I., & MORAN, S. (2007). Optimal implementations of UPGMA and other common clustering algorithms. *Information Processing Letters*, 104(6), 205-210 str.

GUICHOUX, E. ET AL. (2011) 'Two highly validated multiplexes (12-plex and 8-plex) for species delimitation and parentage analysis in oaks (*Quercus* spp.)', *Molecular Ecology Resources*.

JOMBART, T., DEVILLARD, S., & BALLOUX, F. (2010). Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC genetics*, 11(1), 94str.

KAMPFER S., LEXER C., GLÓSSL J., STEINKELLNER H. (1998) Characterization of (GA)<sub>n</sub> microsatellite loci from *Quercus Robur*. *Hereditas*, 129, 183-186 str.

KREMER, A., ZANETTO, A. AND DUCOUSSO, A. (1997) 'Multilocus and multitrail measures of differentiation for gene markers and phenotypic traits', *Genetics*, 145(4), 1229–1241 str.

LINNAEUS, C. (1753) 'Species Plantarum', *Holmiae*, 1(2), 572 str.

PEAKALL, R. AND SMOUSE, P. E. (2006) 'GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research', *Molecular Ecology Notes*, 6(1).

PEAKALL, R. AND SMOUSE, P. E. (2012) 'GenALEX 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update', *Bioinformatics*, 28(19), 2537–2539 str.

SLATE, J., MARSHALL, T. C., ET PEMBERTON, J. M. (2000). A retrospective assessment of the accuracy of the paternity inference program CERVUS. *Molecular Ecology*, 9, 801–808 str.

PETIT, R. J. ET AL. (2004) 'Hybridization as a mechanism of invasion in oaks', *New Phytologist*, 151–164 str.

STEINKELLNER, H. ET AL. (1997) 'Identification and characterization of (GA/CT)<sub>n</sub>-microsatellite loci from *Quercus petraea*', *Plant Molecular Biology*.

STREIFF, R. ET AL. (1998) 'Within-population genetic structure in *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. assessed with isozymes and microsatellites', *Molecular Ecology*, 7(3), 317–328.

STREIFF, R. ET AL. (1999) 'Pollen dispersal inferred from paternity analysis in a mixed oak stand of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl.', *Molecular Ecology*, 8(5), 831–841 str.

ÚHÚL., 2016. Zprávy o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky. [online]. Brandýs nad Labem, ÚHÚL. [cit. 2017-01-29]. Dostupné na World Wide Web: <http://www.uhul.cz/zelenazprava/>

VISCOSI, V. ET AL. (2009) 'Leaf morphological analyses in four European oak species (*Quercus*) and their hybrids: A comparison of traditional and geometric morphometric methods', *Plant Biosystems*, 143(3), 564–574 str.

ZANETTO, A., ROUSSEL, G. AND KREMER, A. (1994) 'Geographic variation of inter-specific differentiation between *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl', *Forest Genetics*, 1(2), 111–123 str.

ZANETTO, A AND KREMER, A (1995) 'Geographical structure of gene diversity in *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. I. Monolocus patterns of variation', *Heredity*, 75(March), 506–517 str.

#### 17.4. Jedle bělokorá

BERGMANN F., GREGORIUS H. R., LARSEN J. B., (1990). Levels of genetic variation in European silver fir (*Abies alba*). Are they related to the species decline? *Genetica* 82 str.

BUČEK A., (2006). Jedle bělokorá (*Abies alba* Mill.) jako ohrožená dřevina. In: Maděra, P.(ed.): Sb.abstr.workshopu Ohrožené dřeviny ČR. ÚLBDG LDF MZLU a MŽP ČR, Brno

CREMER E., LIEPELT S., SEBASTIANI F., BUONAMICI A., MICHALCZYK I.M., ZIEGENHAGEN B., VENDRAMIN G.G., (2006). Identification and characterization of nuclear microsatellite loci in *Abies alba* Mill. *Molecular Ecology Notes*, 6

GÖMÖRY D., PAULE L., KRAJMEROVÁ D., ROMŠÁKOVÁ I., LONGAUER R. (2012). Admixture of genetic lineages of different glacial origin: a case study of *Abies alba* Mill. in the Carpathians. *Plant Systematics and Evolution*, 298 str.

HANSEN O. K., VENDRAMIN G. G., SEBASTIANI F., EDWARDS K.J., (2005). Development of microsatellite markers in *Abies nordmanniana* (Stev.) Spach and cross-species amplification in the *Abies* genus. *Molecular Ecology Notes*, 5

CHRTEK J., TOMŠOVIC P., KOVANDA M., HEJNÝ S., SLAVÍK B., (1988). ed. Květena České socialistické republiky. Praha: Academia

JOMBART, T., DEVILLARD, S., & BALLOUX, F. (2010). Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC genetics*, 11(1), 94str.

KONNERT M., BERGMANN F., (1995). The geographical distribution of genetic variation of silver fir (*Abies alba*, Pinaceae) in relation to its migration history *Plant Syst. Evol.*, 196 str.

LARSEN J. B., (1986). Das Tannensterben. Eine neue Hypothese zur Klärung des Hintergrunds dieser rätselhaften Komplexkrankheit der Weißtanne (*Abies alba* MILL.). *Forstwiss Centralbl* 105

LARSEN J. B., (1989). Waldbauliche Probleme und Genökologie der Weißtanne (*Abies alba* Mill.). *Allgemeine Forst- und Jagdzeitung*, 160

MADĚRA P., ÚRADNÍČEK L., (2001). Dřeviny České republiky. Písek: Matice lesnická, 2001. ISBN 80-86271-09-9

MUSIL I., HAMERNÍK J., (2007). Jehličnaté dřeviny. [Conifers.] Praha, Academia



PEAKALL, R. AND SMOUSE, P. E. (2006) 'GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research', *Molecular Ecology Notes*, 6(1), 288–295 str.

PEAKALL, R., SMOUSE, P. E. (2012) 'GenALEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update', *Bioinformatics*, 28(19), 2537–2539 str

POSTOLACHE, D., LEONARDUZZI, C., PIOTTI, A., SPANU, I., ROIG, A., FADY, B., ... & VENDRAMIN, G. G. (2014). Transcriptome versus genomic microsatellite markers: highly informative multiplexes for genotyping *Abies alba* Mill. and congeneric species. *Plant molecular biology reporter*, 32(3), 750-760 str.

SAGNARD F., BARBEROT C., FADY B., 2002. Structure of genetic diversity in *Abies alba* Mill. from southwestern Alps: multivariate analysis of adaptive and nonadaptive traits for conservation in France. *Forest Ecology and Management*, 157

SLATE, J., Marshall, T. C., ET PEMBERTON, J. M. (2000). A retrospective assessment of the accuracy of the paternity inference program CERVUS. *Molecular Ecology*, 9, 801–808 str.

ÚHÚL., (2016). Zprávy o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky. [online]. Brandýs nad Labem, ÚHÚL. [cit. 2017-01-29]. Dostupné na World Wide Web: <http://www.uhul.cz/zelenazprava/>

ÚRADNÍČEK L., MADĚRA P., TICHÁ S., KOBLÍŽEK J., (2009). Dřeviny České republiky. Kostelec nad Černými lesy, Lesnická práce.

## 17.5. Smrk ztepilý

ACHERÉ V., FAIVRE-RAMPANT P., JEANDROZ S., BESNARD G., MARKUSSEN T., ARAGONES A., FLADUNG M., RITTER E., FAVRE J. M., 2004. A full saturated linkage map of *Picea abies* including AFLP, SSR, ESTP, 5S rDNA and morphological markers. *Theor Appl Genet*. 108:1602–1613 str.

ACHERÉ V., FAVRE J. M., BESNARD G., JEANDROZ S., 2005. Genomic organization of molecular differentiation in Norway spruce (*Picea abies*). *Molecular Ecology*. 14: 3191–3201 str.

BESNARD G., ACHÉRE V., FAIVRE P., RAMPANT, FAVRE J. M., JEANDROZ S., 2003. A set of cross-species amplifying microsatellite markers developed from DNA sequence databanks in *Picea* (Pinaceae). *Molecular Ecology Notes*. 3: 380–383 str.

CAVERS S., BANDO E., 2005. Sampling Tissue for DNA Analysis of Trees : Trunk Cambium as an Alternative to Canopy Leaves, (*Silvae Genetica* 54(6)).

CLARK, M. S., 2013. *Plant molecular biology - a laboratory manual*. Springer Science & Business Media.

DE SOUSA S. N., FINKELDEY R., GAILING O., 2005. Experimental Verification of Microsatellite Null Alleles in Norway Spruce (*Picea abies* [L.] Karst.): Implications for Population Genetic Studies. *Plant Molecular Biology Reporter*. 23: 113-119 str.

ERIKSSON G., EKBERG I., CLAPHAM D., 2006. *An introduction to Forest Genetics*. Department of Plant Biology and Forest Genetics. SLU: 188 str.

- FLUCH S., BURG A., KOPECKY D., HOMOLKA A., SPIESS N, VENDRAMIN G. G., 2011. Characterization of variable EST SSR markers for Norway spruce (*Picea abies* L.). *Fluch et al., BMC Research Notes*. 4: 401str.
- HOLUŠA J., LIŠKA J., 2002. Hypotéza chřadnutí a odumírání smrkových porostů ve Slezsku (Česká republika). *Zprávy lesnického výzkumu*. 47: 9-15 str.
- CHASE M., HILLS H., 1991. Silica Gel: An Ideal Material for Field Preservation of Leaf Samples for DNA Studies. *Taxon*, 40(2): 215–220str.
- JARDE P., LAGODA P. J., 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in ecology & evolution*. 11: 424-429 str.
- JONES A. G., ARDREN W. R., 2003. Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular ecology*. 12: 2511-2523 str.
- LI Y. C., KOROL A. B., FAHIMA T., BEILES A., NEVO E., 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular ecology*. 11: 2453-2465 str.
- MUSIL I., HAMERNÍK J., LEUGNEROVÁ G., 2001. *Lesnická dendrologie I, Jehličnaté a další nahosemenné (a výtrusné) dřeviny*. Skriptum, Lesnická fakulta ČZU, Praha.
- NYSTEDT B., STREET N. R., WETTERBOM A., ZUCCOLO A., LIN Y. C. et al., 2013. The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution. *Nature*. 497: 579–584 str.
- PFEIFFER A., OLIVIERI A. M., MORGANTE M. 1997. Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce (*Picea abies* K.). *Genome*. 40(4): 411-419 str.
- RUNGIS D., BÉRUBÉ Y., ZHANG J., RALPH S., RITLAND C. E., ELLIS B. E., et al., 2004. Robust simple sequence repeat markers for spruce (*Picea* spp.) from expressed sequence tags. *Theoretical and Applied Genetics*. 109: 1283-1294 str.
- SCOTTI I., MAGNI F., FINK R., POWELL W., BINELLI G., HEDLEY P. E., 2000. Microsatellite repeats are not randomly distributed within Norway spruce (*Picea abies* K.) expressed sequences. *Genome*. 43: 41-46 str.
- SCOTTI I., MAGNI F., PAGLIA G. P., MORGANTE M., 2002. Trinucleotide microsatellites in Norway spruce (*Picea abies*): their features and the development of molecular markers. *Theor Appl Genet*. 106: 40–50 str.
- SCOTTI I., PAGLIA G. P., MAGNI F., MORGANTE M., 2002b. Efficient development of dinucleotide microsatellite markers in Norway spruce (*Picea abies* Karst.) through dot-blot selection. *Theor Appl Genet*. 104: 1035–1041 str.
- SELKOE K. A., TOONEN R. J., 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*. 9: 615–629 str.
- SHI Y., FORNERIS N., RAJORA O. P., 2014. Highly Informative Single-Copy Nuclear Microsatellite DNA Markers Developed Using an AFLP-SSR Approach in Black Spruce (*Picea mariana*) and Red Spruce (*P. rubens*). *PLoS ONE*. 9: 114-121 str.

SCHUBERT R., MUELLER-STARCK, G., RIEGEL R., 2001. Development of EST-PCR markers and monitoring their intrapopulational genetic variation in *Picea abies* (L.) Karst. TAG Theoretical and Applied Genetics. 103: 1223-1231 str.

SOFTGENETICS., 2014. GeneMarker. The Biologist Friendly Software. User Manual: 207str.

ÚHÚL., 2016. Zprávy o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky. [online]. Brandýs nad Labem, ÚHÚL. [cit. 2017-01-29]. Dostupné na World Wide Web: <http://www.uhul.cz/zelenazprava/>

VANČURA K., 1995. Příspěvek k výzkumu proměnlivosti smrku ztepilého. Zprávy lesnického výzkumu. 40: 3-4 str.

VENDRAMIN G. G., LELLI L., ROSSI L., MORGANTE M., 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. Molecular Ecology. 5: 595–598 str.

ZANE L, BARGELLONI L, PATARNELLO T., 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. Molecular Ecology. 11: 1-16 str.

#### 17.6. Návrh využití vytvořeného genotypizačního nástroje

JONES AG, ARDREN WR. 2003. Methods of parentage analysis in natural populations. Molecular Ecology 12: 2511-2523.

KALINOWSKI ST, TAPER ML, MARSHALL TC. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. Molecular Ecology 16: 1099-1106.

LAMBETH C, LEE BC, O'MALLEY D, WHEELER N. 2001. Polymix breeding with parental analysis of progeny: an alternative to full-sib breeding and testing. Theoretical and Applied Genetics 103: 930-943.

MARSHALL TC, SLATE J, KRUUK LEB, PEMBERTON JM. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. Molecular Ecology 7: 639-655.

## 17.7. Analýza potřeby ověření sadebního materiálu

BERNHARDT, O.(1996): Forstbaumschulen in der Krise. Allg. Forstz., 51, 1062 str.

BURDA, P. (2009): Ověření pěstebních postupů a využití nových školkařských technologií při pěstování sadebního materiálu lesních dřevin a posouzení kvality vyprodukovaného materiálu. Praha, 107 str.

ČEŠKA, P. (2009): Reprodukční materiál lesních dřevin. Vesmír 88. 2009/7, 59 str.

Česko. Ministerstvo zemědělství. Zákon č. 149 ze dne 23.5.2003 o uvádění do oběhu reprodukčního materiálu lesních dřevin lesnický významných a umělých kříženců, určeného k obnově lesa a k zalesňování, a o změně některých souvisejících zákonů (zákon o obchodu s reprodukčním materiálem lesních dřevin). In Sbírka zákonů České republiky. 2003, částka 57, s. 3279. Dostupné také z WWW:

<<https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2003-149>>

Česko. Ministerstvo zemědělství. Zákon č.29 ze dne 29.1.2004 o obchodu s reprodukčním materiálem lesních dřevin. In Sbírka zákonů České republiky. 2004, částka 9, s.466-528. Dostupné také na z WWW:

<file:///C:/Users/NB/Downloads/sb009-04.pdf>

FRANKE, A. (1963): Situation am Forstbaumschulen in progeny tests of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Studia forestalia suecica* 10, 130 str.

HOSIUS, B., HENKEL, W., BERGMANN, F., HATTERMER, H. H.(1996): Erkennung von Verstößen gegen das Gesetz über forstliches Saat-und Pflanzgut. Allg. Forstz., 53, č.26, 1450 – 1451 str.

JURÁSEK, A., MARTINCOVÁ, J. (2000): Návrh národního standardu kvality reprodukčního materiálu lesních dřevin. Sborník referátů z celostátního odborného semináře s mezinárodní účastí. Opočno, 7. – 8. Března 2000. Jíloviště – Strnady, VÚLHM, 9 – 20 str.

KANTOR, J. ET AL. (1975): Zakládání lesů a šlechtění lesních dřevin. Státní zemědělské nakladatelství Praha. 526 str.

KOTRLA, P., PAŘÍZEK, M., CAFOUREK, J. (2008): Kontrola identity RM pomocí genetických markerů. Lesnická práce. 10/08.

LONGAUER, R., GÖMÖRY, D. (2014): Lesnická genetika. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. 134 str.

Ministerstvo zemědělství. Informační systém Evidence reprodukčního materiálu [online]. Praha: Ministerstvo zemědělství, 2009-2018. Dostupné z WWW: <<http://eagri.cz/public/app/uhul/ERMA2>>

NĚMEC, P. (2015): Současný stav lesního semenářství. In: Quo vadis lesnictví? I. Kam kráčí lesní semenářství a školkařství? Sborník příspěvků. Brno, ČLS při LDF MENDELU v Brně: s. 33–40.

NOVOTNÝ, P., FRÝDL, J., ČÁP, J.(2008): Metodické postupy ověřování zdrojů reprodukčního materiálu lesních dřevin v České republice. Strnady, Lesnický průvodce, s.63.

PALÁTOVÁ, E. (2008): Zakládání lesa I.: lesní semenářství. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. ISBN 978\*80-7375-181-4.

PAŘÍZEK, M. (2008): Získávání reprodukčního materiálu lesních dřevin. Brandýs nad Labem. ÚHÚL. Lesnická práce č. 10/08.

PODEŠVA, V., SOMMER, L., VOTRUBEC, J., FLAŠKÁŘ, M., HARNACH, J., MĚKOTA, J., & JANOUŠEK, M. (2016). Zákon o zadávání veřejných zakázek: Zákon o registru smluv: komentář. Wolters Kluwer.

Rada Evropské unie. Směrnice Rady 1999/05ES ze dne 22. prosince 1999 o uvádění reprodukčního materiálu lesních dřevin na trh. Dostupné také z WWW: < <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:31999L0105> >

ŠINDELÁŘ, J. (2000): Možné důsledky porušování zákona o lesích a dalších normativních ustanovení při nakládání s reprodukčním materiálem lesních dřevin. Zprávy lesnického výzkumu. VÚLHM Jíloviště-Strnady, č.3.

TIKHONINA, O. (2013). Zadávání veřejných zakázek-dynamický nákupní systém a elektronická aukce.

ÚHÚL (2016), Informace o nakládání s reprodukčním materiálem lesních dřevin České republiky 2016, výzkumná zpráva, Ústav pro hospodářskou úpravu lesů Brandýs nad Labem

## 17.8. Legislativa

BUNDESFORSCHUNGSZENTRUM FÜR WALD. Ökologische Genetik und Biodiversität. Wien: Bundesforschungszentrum für Wald, [2017] [cit. 2018-18-04]. Dostupné z WWW: <<https://bfw.ac.at/rz/bfwcms.web?dok=4167>>

Česko. Ministerstvo zemědělství. Zákon č. 149 ze dne 23.5.2003 o uvádění do oběhu reprodukčního materiálu lesních dřevin lesnický významných a umělých kříženců, určeného k obnově lesa a k zalesňování, a o změně některých souvisejících zákonů (zákon o obchodu s reprodukčním materiálem lesních dřevin). In Sbírka zákonů České republiky. 2003, částka 57, s. 3279. Dostupné také z WWW:

<<https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2003-149>>

Česko. Ministerstvo zemědělství. Zákon č.29 ze dne 29.1.2004 o obchodu s reprodukčním materiálem lesních dřevin. In Sbírka zákonů České republiky. 2004, částka 9, s.466-528. Dostupné také na z WWW:

<<file:///C:/Users/NB/Downloads/sb009-04.pdf>>

FOLTÁNEK, V. (2007): Aktuální problematika lesního školkařství. Brno. Sdružení lesních školkařů české republiky. Lesnická práce č.01/07.

GÖMÖRY, D., KRAJMEROVÁ, D., LONGAUER, R. (2012): Admixture of genetic lineages of different glacial origin: a case study of *Abies alba* Mill. In the Carpathians. *Plant Systematics and Evolution*, 298:703-712 str.

KONNERT, M., RUETZ, W. (2006): Genetic aspect of artificial regeneration of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) in Bavaria. *Eur. J. For. Res.* 125, 261-270 str.

KOTRLA, P., PAŘÍZEK, M., CAFOUREK, J. (2008): Kontrola identity RM pomocí genetických markerů. Lesnická práce. 10/08.

LONGAUER, R., GÖMÖRY, D. (2014): Lesnická genetika. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. 134 str.

MAUER, O., ET AL. (2013):. Pěstování sadebního materiálu, Mendelova univerzita v Brně, ISBN: 978-80-7375-698-7.

PALÁTOVÁ, E. (2008): Zakládání lesa I.: lesní semenářství. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. ISBN 978\*80-7375-181-4.

PAŘÍZEK, M. (2008): Získávání reprodukčního materiálu lesních dřevin. Brandýs nad Labem. ÚHÚL. Lesnická práce č. 10/08.

PASLAWSKA, A., BARTKOWIAK, J. (2017): Weryfikacja pochodzenia zasobów genowych. Polsko.

REŠÁTKO, M. (2000): Kontrolní systém reprodukčního materiálu lesních dřevin v Maďarsku. Lesnická práce č.3/00. r.79.

ŠINDELÁŘ, J. (2000): Možné důsledky porušování zákona o lesích a dalších normativních ustanovení při nakládání s reprodukčním materiálem lesních dřevin. Zprávy lesnického výzkumu. VÚLHM Jíloviště-Strnady, č.3.

TULSTRUP, N.P. (1959): International trade in forest tree seed. *Unasylva*. 13(4): 196-201.

ÚHÚL (2016), Informace o nakládání s reprodukčním materiálem lesních dřevin České republiky 2016, výzkumná zpráva, Ústav pro hospodářskou úpravu lesů Brandýs nad Labem

Ústav pro hospodářskou úpravu lesa. Informace o lesích [online]. Brandýs nad Labem: Ústav pro hospodářskou úpravu lesa, 2016 [cit. 2018-18-04]. Dostupné z WWW:<<http://www.uhul.cz/>>

## 17.9. Ekonomická analýza

DE BARBA, M., MIQUEL, C., LOBRÉAUX, S., QUENETTE, P. Y., SWENSON, J. E. AND TABERLET, P. (2017) 'High-throughput microsatellite genotyping in ecology: improved accuracy, efficiency, standardization and success with low-quantity and degraded DNA', *Molecular Ecology Resources*, 17(3), pp. 492–507. doi: 10.1111/1755-0998.12594.

CARROLL, E. L., BRUFORD, M. W., DEWOODY, J. A., LEROY, G., STRAND, A., WAITS, L. AND WANG, J. (2018) 'Genetic and genomic monitoring with minimally invasive sampling methods', *Evolutionary Applications*, (January), pp. 1094–1119. doi: 10.1111/eva.12600.

GUICHOUX E., LAGACHE L., WAGNER, S., LÉGER, P. AND PETIT, R. J. (2011) 'Two highly validated multiplexes (12-plex and 8-plex) for species delimitation and parentage analysis in oaks (*Quercus* spp.)', *Molecular Ecology Resources*, 11(3), pp. 578–585. doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.02983.x.

VARTIA, S., VILLANUEVA-CAÑAS, J. L., FINARELLI, J., FARRELL, E. D., COLLINS, P. C., HUGHES, G. M., CARLSSON, J. EL, GAUTHIER, D. T., MCGINNITY, P., CROSS, T. F., FITZGERALD, R. D., MIRIMIN, L., CRISPIE, F., COTTER, P. D. AND CARLSSON, J. (2016) 'A novel method of microsatellite using individual combinatorial barcoding Subject Category : Subject Areas ', *Royal Society Open Science*, 3, p. 150565. doi: 10.1098/rsos.150565.